

Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Bioquímica

**Modulação redox de peroxirredoxinas e a participação dos  
sistemas da GSH e da Trx na proteção/função celular**

Luiz Felipe de Souza

Tese submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade  
Federal de Santa Catarina  
para obtenção do grau de  
Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Alcir  
Luiz Dafré

Co-orientador: Prof. Dr.  
Marcelo Farina

Florianópolis, 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Luiz Felipe de  
Modulação redox de peroxirredoxinas e a  
participação dos sistemas da GSH e da Trx na  
proteção/função celular / Luiz Felipe de Souza ;  
orientador, Alcir Luiz Dafre; coorientador,  
Marcelo Farina - SC, 2017.  
104 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em ,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

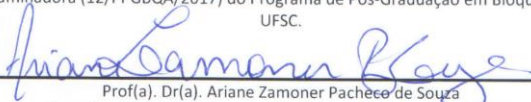
1. . 2. Peroxirredoxinas. 3. Glutathione. 4.  
Estresse oxidativo. 5. Câncer. I. Dafre, Alcir Luiz  
. II. Farina, Marcelo. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . IV.  
Título.

**"Modulação redox de peroxirredoxinas e a participação dos sistemas da GSH e da Trx na proteção/função celular"**

Por

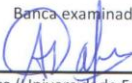
**Luiz Felipe de Souza**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (12/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

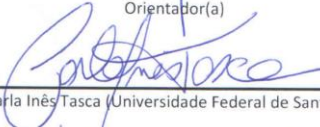


Prof(a). Dr(a). Arian Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Arian Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Flávia Carla Meotti (Universidade de São Paulo)



Dr(a) Deborah de Camargo Hizume Kunzler (Universidade do Estado de Santa Catarina)



Dr(a) Maurício Pereira Cunha (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 08 de março de 2017.



## Agradecimentos

Primeiramente, meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, mentor e amigo Prof. Alcir Luiz Dafre. Foram 10 anos trabalhando juntos, nos quais sempre deu a atenção e incentivos necessários para a minha formação. Por todo esse tempo, sou intensamente grato.

Também quero agradecer ao Prof. Marcelo Farina, que sempre foi extremamente atencioso e disposto a ajudar no desenvolvimento do trabalho

Agradeço imensamente a Dra. Christine Winterbourn que me acolheu em seu laboratório durante o meu doutorado sanduíche, permitindo que trabalhasse ao lado de grandes pesquisadores no *Center for Free Radical Research*, aonde aprendi muito. Também agradeço a todos os colegas do centro me ajudaram durante essa estadia, em especial à Mark Hampton, Paul Pace, Andree Pearson, Alexander Peskin, Nina Dickerhof e Andreas Kornstofer.

Também sou muito grato aos meus colegas e amigos no Laboratório de Defesas Celulares: Ariana Shmitz, Rafael Trevisan, Daniele Mello, Naissa Daniele, Gudrian Almeida, Mariana Uchôa, Bárbara dos Santos, Josimar, além de outros que transformaram o ambiente de trabalho em uma segunda casa. Também agradeço colegas de outros laboratórios: Dirleise Colle, Danúbia dos Santos, além de muitos outros que sempre me ajudaram durante esses anos.

Agradeço as agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPESC por proporcionarem as condições financeiras para que esse trabalho pudesse ser realizado. Também agradeço à UFSC e ao departamento de bioquímica por todos os anos de aprendizagem.

Agradeço a minha família, por ter me fornecido toda a educação e incentivo necessários para perseguir meus objetivos. Por último, mas não menos importante, agradeço à minha companheira Megumi, que esteve do meu lado desde antes do doutorado. Agradeço a toda a paciência e suporte durante todos esses anos.



## Resumo

Tióis celulares estão entre os principais alvos das espécies reativas de oxigênio (ERO), portanto, estão no centro dos processos redox celulares. A oxidação de tióis proteicos pode levar à perda de função de enzimas, modulação de vias de sinalização e morte celular; assim, a manutenção do estado redox destes tióis é crucial para a homeostasia celular. Os sistemas da glutatona (GSH) e da tiorredoxina (Trx) são considerados os principais tampões redox celulares e são os principais sistemas envolvidos na manutenção do estado redox celular. A contínua reciclagem das formas oxidadas da GSH e Trx pelas enzimas glutatona redutase (GR) e tiorredoxina retudase (TrxR) é crucial para este processo, mantendo o contínuo fluxo de elétrons para peroxidases. A glutatona peroxidase (GPx) e as peroxirredoxinas (Prx) estão entre as peroxidases mais eficientes. As Prx são consideradas sensores de  $H_2O_2$ , participando de vias de sinalização redox, sendo o estado de oxidação de sua cisteína catalítica um marcador de estresse oxidativo. A perda da homeostasia redox tem sido correlacionada com diversas situações patológicas, como inflamação e câncer. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar a importância dos sistemas da GSH e Trx na proteção de células contra oxidantes, além de estudar a modulação redox das Prx durante a fagocitose em neutrófilos. No primeiro trabalho investigamos o efeito de 2-acetyl-amino-3-[4-(2-acetyl-amino-2-carboxyethylsulfanyltiocarbonylamino)phenylthiocarbamoylsulfanyl] propionic acid (2-AAPA), um inibidor da GR, sobre parâmetros de viabilidade celular e balanço redox em células derivadas de glioblastoma humano A172. Nossos dados demonstram que o 2-AAPA, além de inibir a GR, também é um potente inibidor da TrxR. A inibição dessas enzimas por 2-AAPA diminuiu drasticamente a capacidade dessas células em metabolizar peróxidos orgânicos, deixando as células mais vulneráveis a este peróxido. 2-AAPA apresentou um perfil de toxicidade tempo- e concentração-dependente. A oxidação da Prx 1, Prx2 e Prx3 foi observada apenas na concentração tóxica de 100

$\mu\text{M}$ , após 30 min de incubação. 2-AAPA também causou uma severa disfunção mitocondrial, afetando o potencial de membrana e respiração acoplada a produção de ATP. Apresentamos evidências de que a oxidação de peroxirredoxinas e disfunção mitocondrial são eventos precoces na toxicidade de 2-AAPA a células A172. Coletivamente, esses dados reforçam a hipótese do papel central dos sistemas da GSH e Trx na proteção de células a agentes oxidantes, e reforça a hipótese de que a inibição conjunta de GR e TrxR pode ser uma estratégia interessante para o tratamento de câncer. No segundo trabalho, estudamos a modulação redox de Prx durante o *burst oxidativo* em células pró-mielocíticas HL60 diferenciadas em neutrófilos. Demonstramos que a diferenciação dessas células com DMSO diminui a expressão da Prx2 de uma maneira tempo dependente, mas não alterou os níveis de Prx1, indicando um possível papel regulatório da Prx2 na diferenciação dessas células por DMSO. Enquanto isso, a diferenciação com ATRA não alterou os níveis de Prx2. A estimulação das células diferenciadas com forbol miristato acetato ou *staphylococcus aureus* induziu o *burst oxidativo* nas células diferenciadas, levando à oxidação da Prx1 de uma maneira tempo-dependente. A oxidação da Prx1 foi dependente da atividade da NADPH oxidase, já que a sua inibição aboliu esse efeito. Além disso, demonstramos que a inibição da NADPH oxidase por *Diphenyleneiodonium chloride* diminui a oxidação basal da Prx1. Por último, discutimos os resultados apresentados com dados obtidos em neutrófilos durante a minha estadia no *Center for Free Radical Research* da Nova Zelândia, sob orientação da Christine Winterbourn. Mostramos que as Prx estão completamente oxidadas em condições basais, um fenômeno nunca antes observado. Assim, apresentamos dados relevantes que podem ter implicações importantes para a sinalização redox e, conseqüentemente, para a função de células inflamatórias. De modo geral, os dados apresentados ressaltam a importância da modulação do ambiente redox na função e morte celular.

Palavras chave: Peroxirredoxina, Glutathiona, Tiorredoxina, 2-AAPA, Tiól.



## Abstract

Thiol groups are amongst the main targets of reactive oxygen species (ERO), therefore they are at the center of all redox processes in the cell. Protein thiol oxidation can lead to loss of function, response signaling and cell death and, hence, the maintenance of thiols in cell is critical for cellular homeostasis. The glutathione (GSH) and thioredoxin (Trx) systems are the main redox buffers in cells. The continuous recycling of the oxidized forms of GSH and Trx is achieved by the action of glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR), which keep the constant supply of electrons for the peroxidases. Among these, the peroxiredoxins (Prx) have a special role, acting as a peroxide sensor and marker of oxidative stress. The loss of redox homeostasis has been linked to several pathologies such as inflammation and cancer. Therefore, this work aims at study the importance of the GSH and Trx systems to cell protection against oxidants, and to analyze the redox modulation of Prx during inflammatory processes. In the first work, we investigated the effect of 2-acetylamino-3-[4-(2-acetylamino-2-carboxyethylsulfanylthiocarbonylamino)phenylthiocarbamoylsulfanyl]propionic acid (2-AAPA), an inhibitor of GR and TrxR, on parameters of cell viability and redox balance in A172 glioblastoma cells. The inhibition of these enzymes drastically reduced cell's capacity to metabolized organic peroxides (but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and, consequently, rendered cells more susceptible to organic peroxide. 2-AAPA also displayed a time and concentration dependent toxicity. We observed a marked oxidation of Prx 1, 2 and 3, as well as a severe mitochondrial dysfunction. Collectively, our results highlight the importance of GSH and Trx systems to cell's protection against oxidants. Also, we present evidence that oxidation of Prx and mitochondrial dysfunction are early events in 2-AAPA toxicity to A172 cells. In the second work, we studied the redox modulation of Prx during oxidative burst in differentiated promyelocytic HL60 cells. We demonstrated that the differentiation of these cells to a neutrophil-like phenotype with dimethylsulfoxide (DMSO) greatly

diminished Prx2 expression in a time-dependent manner, but didn't change Prx1 expression. Pharmacological stimulation or exposure to microbes induced the oxidative burst in the differentiated cells, leading to Prx1 oxidation in a time-dependent manner. Oxidation of Prx1 was dependent on NADPH oxidase, because inhibition of this enzyme abolished this effect. Furthermore, inhibition of the oxidase by *Diphenyleneiodonium chloride* reduced the basal oxidation of Prx1 in unstimulated cells. Lastly, we discuss the presented results with data obtained from human neutrophils during my stay at the *Center for Free Radical Research* in New Zealand under supervision of Christine Winterbourn. We show for the first time that the Prx are completely oxidized under unstimulated conditions. Therefore, the presented results may have important implications for the role of Prx in inflammatory cells function. Overall, this thesis highlights the central role of the modulation of the redox environment to cell function and death, as well as shows, for the first time, a Prx fully oxidized in unstressed conditions.

Keywords: Peroxiredoxin; Glutathione; Thioredoxin; Thiol metabolism, 2-AAPA

## Lista de Figuras

Figura 1. Formação e metabolismo das principais espécies reativas de oxigênio.....	19
Figura 2. Ciclo catalítico da glutathione peroxidase .....	26
Figura 3. Metabolismo da glutathione. ....	28
Figura 4. Ciclo catalítico da tioredoxina/tiorredoxina redutase	29
Figura 5. Ciclo catalítico das peroxirredoxinas .....	31
Figura 6. Sinalização celular por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	34
Figura 7. Modulação do estado redox dos tióis em proteínas. ...	35
Figura 8. Análise concentração e tempo-resposta da viabilidade celular de células tratadas com 2-AAPA. ....	46
Figura 9. 2-AAPA é um potente inibidor da atividade da GR e TrxR.....	47
Figura 10. Diminuição da taxa de eliminação de peróxidos pelo tratamento com 2-AAPA. ....	49
Figura 11. 2-AAPA leva à dimerização das peroxirredoxinas em células A172. ....	51
Figura 12. Função mitocondrial em células A172 expostas a 2-AAPA. ....	53
Figura 13. Modulação dos níveis de GSH-t e de tióis não proteicos em células A172 tratadas com 2-AAPA. ....	54
Figura 14. Expressão e estado redox da enzima glutamato-cisteína ligase e expressão da enzima NADPH quinona oxidoreductase. ....	55
Figura 15. Marcadores de diferenciação de células HL60. ....	67
Figura 16. Modulação da expressão de Prx1 ePrx2 pela diferenciação de células HL60 por DMSO. ....	68
Figura 17. Estimulação de células dHL60 com PMA leva a oxidação da Prx1.....	70
Figura 18. Efeito da inibição da NADPH oxidase na modulação do estado redox da Prx1 em dHL60 expostas à <i>S. aureus</i> .....	72



## Lista de Abreviaturas

•OH – Radical hidroxil	G6PDH – Glicose 6-fosfato
$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlet	desidrogenase
ASK1- Apoptosis signaling kinase 1	GCL – Glutamato-cisteína ligase
BCNU – N,N-bis(2- chloroethyl)-N-nitrosourea	GGT – $\gamma$ -glutamil transpeptidase
BSO - buthionine sulfoximine	GPx – Glutaciona peroxidase
BSA – Albumina de soro bovino	GR – Glutaciona redutase
CAT – Catalase	GSH – Glutaciona na forma reduzida
CHP – Peróxido de cumeno	GSH-t – Glutaciona total
DNA – Ácido desoxirribonucléico	GSSG – Dissulfeto de glutaciona, ou glutaciona oxidada
DPI - Diphenyleneiodonium chloride	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2- nitrobenzóico)	Keap1 – do inglês: ( <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> )
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético	NAD <sup>+</sup> – Dinucleótideo de nicotinamida adenina, forma oxidada
ERO – Espécies reativas de oxigênio	

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida

NPSH – Tióis não proteicos

Nrf2 – Do inglês: (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NO – Óxido nítrico

$O_2^{\cdot-}$  – Ânion superóxido

$OH^{\cdot}$  – Ânion hidroxila

PARP1 – poli-(ADP-ribose)-polimerase 1

PCA – ácido perclórico

Prx – Peroxirredoxina

PSH – Tióis protéicos

$ROO^{\cdot}$  – Radical peroxil

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em géis de poliacrilamida

SOD – Superóxido dismutase

TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

Trx – Tiorredoxina reduzida

Trx-S<sub>2</sub> – Tiorredoxina oxidada

TrxR – Tiorredoxina redutase

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>17</b>
1.1. Oxigênio e espécies reativas de oxigênio.....	17
1.2 Entendendo as ERO .....	17
1.4. Defesas antioxidantes.....	22
1.4.1. Superóxido dismutase.....	23
1.4.2. Catalase .....	24
1.4.3. Sistema da glutathiona/glutathiona peroxidase .....	24
1.4.4. Sistema da tioredoxina/peroxirredoxina .....	28
1.5. Justificativa.....	37
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>38</b>
Objetivo geral .....	38
<b>3. Papel do 2-AAPA, um conhecido inibidor da enzima glutathiona redutase, sobre o estado redox e degradação de peróxidos em células A172 derivadas de glioma humano. ...</b>	<b>39</b>
3.1. Introdução.....	39
2.2. Materiais e métodos .....	41
2.2.1 Cultura celular e análise de viabilidade .....	41
2.2.2 Atividade de enzimas antioxidantes.....	41
2.2.2. Consumo de peróxido .....	42
2.2.3 Western blot.....	42
2.2.4. Função mitocondrial .....	43
2.2.5. Glutathiona total, tióis não proteicos e tióis protéicos.....	44
2.3. Resultados .....	45
3.4. Discussão.....	56

<b>4. Estado redox das peroxiredoxinas em cultivos de neutrófilos humanos e células HL60.....</b>	<b>62</b>
4.1. Introdução.....	62
3.2 Materiais e métodos .....	65
3.2.2 Preparação de Staphylococcus aureus .....	65
3.2.3 Detecção da produção de superóxido pela redução do citocromo C .....	66
3.2.4 Detecção das Prx por Imunoblot.....	66
4.3 Resultados .....	66
3.4. Discussão.....	73
<b>5. Conclusões e perspectivas.....</b>	<b>77</b>
<b>Referências .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo I - Publicações e outras atividades desenvolvidas durante o doutorado .....</b>	<b>93</b>
<b>Anexo II – Estudos relacionados a esta tese deram origem aos seguintes manuscritos. ....</b>	<b>96</b>



## **1. Introdução**

### **1.1. Oxigênio e espécies reativas de oxigênio**

O oxigênio é essencial para a vida como conhecemos. É o terceiro elemento mais abundante no universo, mas geralmente se encontra na forma de água ou de outros óxidos. As altas concentrações de  $O_2$  na atmosfera terrestre (~21%) aparentam ser um caso raro no universo e só é possível pela ação de organismos fotossintetizantes. Há aproximadamente 2.2 bilhões de anos atrás, estes organismos começaram a liberar oxigênio molecular através da hidrólise da água, criando a camada de ozônio que hoje filtra boa parte dos raios UV que chegam na terra. Além disto, a utilização do oxigênio permitiu retirar o ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) dos oceanos, formando óxidos de ferro. Como um dos elementos mais eletronegativos, a utilização do oxigênio como acceptor final de elétrons na respiração celular proporcionou um aumento extraordinário na produção de energia pelos organismos. A partir daí a vida pôde adquirir uma complexidade nunca antes vista.

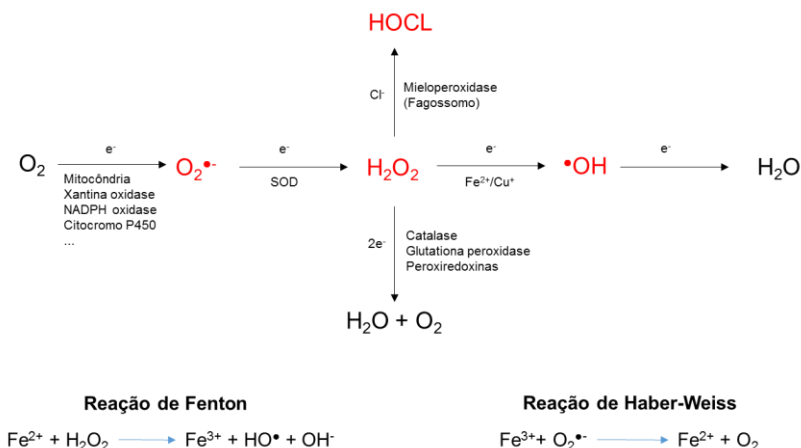
Apesar dos benefícios que o oxigênio trouxe à vida do planeta, a presença deste elemento também trouxe diversas consequências deletérias para os seres vivos. Por ser um radical, o  $O_2$  reage prontamente com outros radicais. Algumas enzimas essenciais, como a ribonucleotídeo redutase, utilizam radicais glicil como intermediários catalíticos e são prontamente inativadas na presença de  $O_2$  (EKLUND; FONTECAVE, 1999). Além disso, o metabolismo do oxigênio gera espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar danos a moléculas de DNA, lipídeos e proteínas, comprometendo a função destas biomoléculas.

### **1.2 Entendendo as ERO**

O termo ERO corresponde a um diverso grupo de intermediários reativos formados na redução incompleta do  $O_2$  à água. Esses intermediários abrangem tanto radicais livres (moléculas com elétrons desemparelhados na última camada de valência) e espécies reativas não radicalares. Apesar desse grupo ter sido tradicionalmente tratado como uma só entidade, as diferentes ERO possuem características químicas

distintas. As ERO, juntamente com as espécies reativas de nitrogênio, constituem as duas classes de moléculas de alta reatividade de maior relevância biológica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007).

As células produzem ERO continuamente por diversas vias endógenas e exógenas. Como apresentado na Figura 1, as ERO são formadas a partir da adição sequencial de elétrons ao oxigênio. A redução univalente do oxigênio gera o radical superóxido, que dá origem ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela sua subsequente redução. Devido a sua reatividade ser relativamente baixa, os níveis de  $H_2O_2$  na célula são controladas por diversas peroxidases. A adição de um elétron ao  $H_2O_2$  pode ser catalisada por metais como Fe e Cu, gerando o radical hidroxila ( $HO\bullet$ ). O  $H_2O_2$  pode ainda ser usado por algumas células para gerar outros oxidantes, como o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) gerado por células fagocitárias para combater patógenos bacterianos.



**Figura 1. Formação e metabolismo das principais espécies reativas de oxigênio.**

Superóxido é produzido pela redução de um elétron do oxigênio molecular. A dismutação do superóxido pode ocorrer espontaneamente ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) e leva a formação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nos fagossomos de neutrófilos, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser usado para gerar ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Em outras células,  $\text{H}_2\text{O}_2$  é degradado à água por peroxidases. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  ainda pode gerar o radical hidroxila em uma reação catalisada por ferro ou cobre (reação de Fenton). Ao participar da reação de Fenton, o ferro-férrico pode ser reduzido por um radical superóxido, contribuindo, assim, para a formação do radical hidroxila (Reação de Haber-Weiss). A figura foi adaptada de (PAULSEN; CARROLL, 2013).

A mitocôndria é considerada uma das principais fontes de ERO em células de mamíferos. Algumas enzimas na cadeia transportadora de elétrons podem doar apenas um elétron para o oxigênio molecular, gerando o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Os mecanismos dessa reação ainda não estão muito bem elucidados, mas acredita-se que um complexo ferro-enxofre no complexo 1 seja a principal fonte de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na matriz mitocondrial (VALKO et al., 2007). O complexo 3 mitocondrial também pode produzir  $\text{O}_2^{\bullet-}$  através da reação do  $\text{O}_2$  com uma semiubiquinona

instável, gerando  $O_2^{\bullet-}$  tanto no espaço intermembranas como na matriz mitocondrial (HOFFMAN; BROOKES, 2009). Outras flavoproteínas, como a  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase, *electron transfer flavoprotein*, piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, também contribuem para a produção de ERO mitocondrial (BINDOLI; RIGOBELLO, 2013; STARKOV et al., 2004). Estima-se que cerca de 0,12 a 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria pode ser liberado na forma de  $O_2^{\bullet-}$ , porém esse valor provavelmente está superestimado pela falta de modelos confiáveis para estudos *in vivo* (MURPHY, 2009).

Outras enzimas não mitocondriais podem contribuir para a produção de ERO. A flavoproteína acil-CoA oxidase, envolvida na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, passa 2 elétrons ao  $O_2$  gerando  $H_2O_2$  (FRANSEN et al., 2012). A xantina oxidase, que está envolvida na degradação de purinas, pode gerar  $O_2^{\bullet-}$  ou  $H_2O_2$  como um subproduto de sua reação catalítica (ABRAMOV; SCORZIELLO; DUCHEN, 2007). Em especial, temos as enzimas NADPH oxidases (NOX). Essas são uma família de complexos enzimáticos transmembrana que catalisam a redução monoelétrica do  $O_2$ , gerando  $O_2^{\bullet-}$ . Estas enzimas utilizam equivalentes redutores do NADPH para esta reação (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007). Elas produzem superóxido como produto principal e tem um papel central na defesa do organismo contra patógenos, o que é especialmente importante para células inflamatórias de defesa.

O metabolismo de diversas drogas e xenobióticos ainda é outra fonte de ERO. A redução de quinonas pela enzima citocromo P450 gera  $O_2^{\bullet-}$  através de um ciclo redox (WINTERBOURN, 2008). De fato, esse é o mecanismo de toxicidade de diversos pesticidas como o paraquat, por exemplo (NUNES et al., 2016). Radiação ionizante e UV também geram ERO. Radicais formados pela radiação UV estão relacionados a processos de envelhecimento e câncer de pele (PANICH et al., 2016).

A toxicidade das ERO se deve basicamente a sua capacidade em oxidar estruturas celulares. Porém, diferentes ERO podem causar danos por diferentes mecanismos. Radicais como o  $O_2^{\bullet-}$  e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) estão envolvidas em reações de um elétron e muitas vezes geram reações em cadeias. Já as ERO não radicalares, como  $H_2O_2$  ou ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), estão envolvidos em reações de dois elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; WINTERBOURN, 2008).

Apesar do nome superóxido, esse radical não é muito reativo em meio aquoso e pode oxidar apenas alguns alvos biológicos. Um importante mecanismo de toxicidade do  $O_2^{\bullet-}$ , contudo, é a oxidação de centros ferro/enxofre  $[4Fe-4S]$  de proteínas. Nessa reação, o  $O_2^{\bullet-}$  oxida

um dos átomos de ferro do centro ferro/enxofre, sendo reduzido à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , liberando  $\text{Fe}^{2+}$  da enzima que fica inativada (FLINT; TUMINELLO; EMPTAGE, 1993). A enzima aconitase do ciclo de Krebs, por exemplo, possui estes centros de ferro/enxofre  $[\text{4Fe-4S}]$  no seu sítio catalítico e é prontamente inativada na presença de superóxido (GARDNER; FRIDOVICH, 1991). O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode ainda reagir com o óxido nítrico gerando o peroxinitrito, um oxidante mais forte que o próprio  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O destino da maior parte do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formado é a sua dismutação à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um processo tanto espontâneo ( $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) como catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) ( $k \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HSU et al., 1996). O ânion superóxido ainda é carregado negativamente e, portanto, tem sua ação restrita por não ultrapassar facilmente membranas biológicas. Entretanto, há evidências que ele pode atravessar canais de cloreto (MUMBENGEGWI et al., 2008).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um oxidante forte (potencial de redução = 1,32 V em pH 7,0), porém possui uma alta barreira de ativação e dessa forma reage muito lentamente com a maioria dos constituintes celulares (WINTERBOURN, 2013). Apesar disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode oxidar diretamente alguns grupos tióis de proteínas, formando ácido sulfênico, sulfônico e sulfínico, além de dissulfetos, que geralmente resultam em alterações na estrutura e função das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2007; RIGOBELLO et al., 2005). A oxidação de resíduos de cisteínas na actina, por exemplo, pode levar a modificações na estrutura do citoesqueleto, gerando estruturas anômalas nas membranas celulares (“membrane bebbling”) (DALLE-DONNE, 2001; FIASCHI et al., 2006). Outras enzimas envolvidas no metabolismo energético, como gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, succinato desidrogenase e aconitase também são inativadas na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CECARINI et al., 2007; PERALTA et al., 2015). Ao contrário do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é permeável a membranas biológicas, podendo difundir e agir em locais distantes de onde foi produzido.

O radical hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) é formado pela redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por alguns metais de transição, como  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ , pela reação de Fenton (Fig. 1). O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ainda pode contribuir para a formação de  $\text{HO}^{\bullet}$ , reduzindo o  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  (Fig. 1, Reação de Haber-Weiss). Este radical reage rapidamente com todos os componentes celulares e possui uma meia vida de  $10^{-9}$  s, reagindo perto do local aonde foi produzido (VALKO et al., 2007; WINTERBOURN, 2013). Sua reação com fosfolípidos poliinsaturados de membrana, por exemplo, pode dar origem a um radical

lipídico e iniciar uma cascata de lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A lipoperoxidação de membranas, por sua vez, pode resultar em mudanças na estrutura e fluidez de membrana podendo ter consequências para a função e morte celular (YANG; STOCKWELL, 2016). Em proteínas, resíduos de Pro, Arg, Lys e Thr, são especialmente suscetíveis à ataque por  $\text{HO}^\bullet$ , gerando grupos carbonilas, que por sua vez podem alterar sua função (DALLE-DONNE et al., 2003). A carbonilação é geralmente utilizada em análises laboratoriais como um marcador de dano oxidativo a proteínas. Por último,  $\text{HO}^\bullet$  pode oxidar bases nitrogenadas ou o esqueleto deoxiribosil da molécula de DNA. Este processo pode levar a quebras nas duplas-fitas de DNA, além de levar a potenciais mutações, tendo uma importante relevância em algumas patologias, tais como o câncer (DIZDAROGLU et al., 2002; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

O ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) é outra ERO de grande importância biológica.  $\text{HOCl}$  é produzido pela mieloperoxidase no fagossomo de neutrófilos. Apesar de ser um oxidante mais fraco que  $\text{H}_2\text{O}_2$  (potencial de redução = 1,28 V em pH 7,0),  $\text{HOCl}$  possui uma barreira de ativação menor e realiza oxidação de dois elétrons de tióis e resíduos de metionina em proteínas (WINTERBOURN, 1985).  $\text{HOCl}$  é um das principais “armas” utilizadas pelos neutrófilos para matar microorganismos, mas também pode difundir para fora do fagossomo e causar danos nos neutrófilos (CHAPMAN et al., 2002).

Quando os níveis de ERO não são controlados pela maquinaria antioxidante, esses podem contribuir para a exacerbação destes danos e morte celular. De fato, a iniciação e desenvolvimento de diversas patologias envolve a participação de ERO, como isquemia-reperfusão, inflamação, câncer, doenças neurodegenerativas (ABRAMOV; SCORZIELLO; DUCHEN, 2007; ANDERSEN, 2004; DALLE-DONNE et al., 2007; VALKO et al., 2007), além de estar envolvido no processo de envelhecimento (MAHER, 2005).

#### **1.4. Defesas antioxidantes**

Tendo em vista o potencial tóxico das ERO, os organismos desenvolveram complexos sistemas antioxidantes para se sobreviver neste ambiente oxidativo. Além disso, estudos recentes têm mostrado que as células aeróbicas também podem utilizar as ERO na sinalização celular,

modulando diversos processos celulares como diferenciação, proliferação e morte. A oxidação de tióis de proteínas, por exemplo, tem sido extensamente estudada nos últimos anos, sendo reconhecida como uma forma de regulação pós-traducional tão comum e importante como a sinalização por fosforilação. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  participa como um mediador central desse processo, modulando diversas funções celulares. Os mecanismos envolvidos na sinalização redox, no entanto, estão apenas começando a ser desvendados.

As defesas antioxidantes podem ser de natureza enzimática ou não enzimática e têm a função de manter as ERO a níveis não tóxicos. Entre os antioxidantes não enzimáticos mais importantes estão a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), o tripeptídeo glutationa (GSH), entre outros. O ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol podem reagir diretamente com diversos radicais mais reativos, estabilizando-os e os tornando menos reativos. Enquanto o ácido ascórbico é hidrofílico e atua na fase aquosa, o  $\alpha$ -tocoferol é lipofílico, atuando em ambientes apolares, como membranas celulares, aonde este impede cascatas de lipoperoxidação (ROSE; BODE, 1993; VALKO et al., 2007). Em condições fisiológicas, a capacidade antioxidante da célula controla os níveis de ERO presentes, garantindo a homeostasia redox celular. Porém, quando a produção de ERO se torna excessiva ou a maquinaria antioxidante celular está comprometida, ocorre a quebra da homeostasia redox, denominado estresse oxidativo (JONES, 2008).

#### 1.4.1. Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) ( $k \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) promove a dismutação do ânion  $\text{O}_2^{\cdot -}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (MCCORD; KEELE; FRIDOVICH, 1971). Já foram descritas 3 tipos de SOD em eucariotos: uma que possui cobre e zinco no seu sítio catalítico (Cu/Zn-SOD) é encontrada no citoplasma; uma que utiliza manganês no processo catalítico (Mn-SOD) é encontrada na mitocôndria, e uma enzima cobre/zinco localizada no meio extracelular (DHAR; ST. CLAIR, 2012). A importância desta enzima foi demonstrada por Lebovitz *et al.*, que geraram camundongos *knockout* para a Mn-SOD mitocondrial. Esses animais apresentaram anemia severa, redução no tempo de vida (vivem apenas 3 semanas), neurodegeneração dos neurônios dos gânglios basais e do tronco encefálico, e apresentam danos mitocondriais em neurônios e células cardíacas (LEBOVITZ et al., 1996).

### 1.4.2. Catalase

A catalase (CAT) é uma das 3 enzimas principais capazes de degradar  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células. A CAT é um homotetrâmero e necessita de um grupo heme para a sua atividade catalítica. Ela é uma das enzimas mais rápidas conhecidas na natureza ( $k \sim 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) e não necessita de nenhum outro cofator para a sua atividade, porém possui baixa afinidade pelo peróxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além disso, a CAT é restrita quase que exclusivamente nos peroxissomos na maioria das células, o que limita a sua atividade contra  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado em outros locais na célula (SCHRADER; FAHIMI, 2006). Assim, evidências sugerem que a CAT seja mais relevante quando há excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (MITOZO et al., 2011; WINTERBOURN, 2013).

### 1.4.3. Sistema da glutatona/glutationa peroxidase

O tripeptídeo glutatona ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina; GSH) é o principal tiól de baixo peso molecular, possuindo um papel central na modulação do estado redox celular. A GSH está presente em todas as células eucarióticas em concentrações de 1-10 mM. A GSH possui funções cruciais, tais como a redução do ácido ascórbico e do  $\alpha$ -tocoferol, transporte de aminoácidos pela membrana plasmática, detoxificação de xenobióticos, além de servir como cofator de enzimas antioxidantes (COUTO; WOOD; BARBER, 2016; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A síntese de GSH ocorre pela ação de 2 enzimas: glutamato-cisteína ligase (GCL) e glutatona sintetase (PASTORE et al., 2003). A GCL é responsável pela primeira das duas reações dependente de ATP, formando  $\gamma$ -glutamilcisteína a partir de glutamato e cisteína. Em seguida, a glutatona sintetase adiciona a glicina gerando uma molécula de GSH. A reação catalisada pela GCL parece ser o passo limitante na síntese de GSH e é um ponto crucial de regulação dos níveis de GSH. A GCL é regulada por diversos fatores, entre eles a disponibilidade de cisteína e a atividade da GCL (FRANKLIN et al., 2009; GRIFFITH, 1999; LU, 2013). A GCL é composta por duas subunidades: uma subunidade de aproximadamente 73 kDa que apresenta atividade catalítica (GCLc), e uma subunidade modulatória (GCLm) de aproximadamente 31 kDa. A subunidade GCLm não apresenta atividade catalítica, mas a sua ligação à GCLc diminui o  $K_m$  desta pelo glutamato e ATP, aumentando enormemente a atividade da holoenzima (YANG et al., 2007). A GCL é

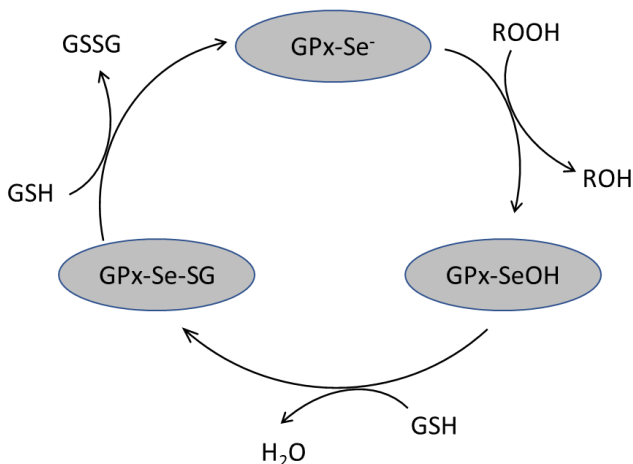


inibida por um feedback negativo pela presença de elevados níveis de GSH, competindo pelo sítio de ligação do glutamato (GRIFFITH, 1999; LU, 2013). A GCL ainda é regulada por uma grande gama de modificações pós-traducionais, como fosforilação e oxidação (FRANKLIN et al., 2009; FRASER et al., 2003).

A glutatona peroxidase (GPx) são uma família de peroxidases que utilizam os equivalentes redutores da GSH para degradar  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos. O ciclo catalítico das GPx está exemplificado na Figura 2. Já foram identificadas 8 isoformas de GPx em mamíferos. As enzimas GPx1 a GPx4 possuem uma selenocisteína no seu sítio catalítico que reage rapidamente com peróxidos ( $k \sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$ ), fazendo com que essas enzimas sejam eficientes em degradar peróxidos, mesmo em baixas concentrações (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; FLOHÉ et al., 2011). A GPx1 é expressa ubiquitadamente no citosol e mitocôndria, enquanto a GPx4 protege as membranas biológicas de peróxidos orgânicos. Camundongos deficientes em GPx1 se desenvolvem normalmente, sugerindo que a modulação de outros antioxidantes pode suprir a perda dessa enzima. Por outro lado, esses animais se tornam mais vulneráveis a danos oxidativos (CHENG et al., 1997; DE HAAN et al., 1998). A GPx1 também parece ser essencial para a eliminação eficiente de peróxidos orgânicos (LIDDELL et al., 2006). Por outro lado, camundongos sobre-expressando GPx1 possuem uma maior taxa de sobrevivência à altas doses de LPS (MIROCHNITCHENKO et al., 2000), e a sobre-expressão de GPx1 protege células contra danos no DNA induzido por irradiação UV (BALIGA et al., 2007). A GPx4 se encontra nas membranas biológicas e é a única GPx capaz de degradar peróxidos orgânicos complexos (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; TAKEBE et al., 2002). Camundongos deficientes em GPx4 (GPx4<sup>-/-</sup>) morrem ainda no útero e células de animais heterozigotos (GPx4<sup>+/-</sup>) apresentam maior vulnerabilidade a danos oxidativos e maior lipoperoxidação (CHEN et al., 2008; DE HAAN et al., 1998; YANT et al., 2003). Além disso, a GPx4 parece ser um modulador central da morte celular por ferroptose (YANG; STOCKWELL, 2016).

A GPx2 é expressa principalmente no epitélio gastrointestinal, protegendo esse tecido contra peróxidos derivados da alimentação; a GPx3 no plasma; a GPx5 é uma proteína secretada no epidídimo; e a GPx6 no epitélio olfatório (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Interessantemente, a GPx5, 7 e 8 possuem uma cys ao invés da selenocisteína encontrada nas GPx1-4. Em ratos e camundongos, a GPx6 também possui uma cys catalítica. A GPx7 e 8 apresentam atividade

peroxidase muito baixa, e suas funções ainda não foram esclarecidas (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).



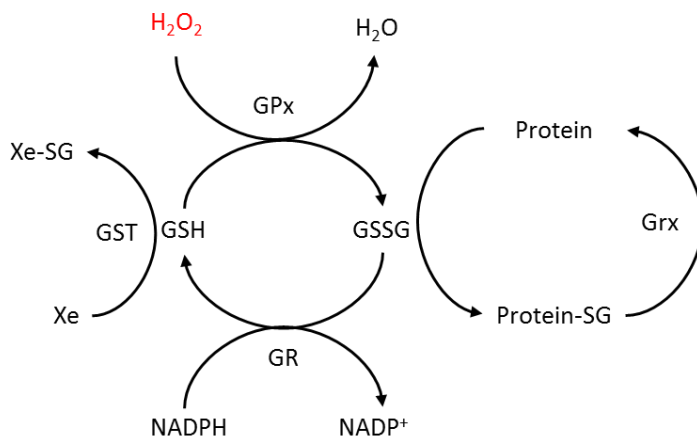
### Figura 2. Ciclo catalítico da glutatona peroxidase

O selenol da selenocisteína (-Se<sup>-</sup>) ataca a molécula de peróxido (ROOH), liberando seu álcool correspondente (ROH), formando o intermediário ácido selênico (-SeOH). Este reage rapidamente com uma molécula de GSH, liberando água. A ligação GPx-Se-SG é reduzido por uma segunda molécula de GSH, liberando água e a forma oxidada da GSH (GSSG). Figura adaptada de (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).

Ao doar elétrons, a GSH forma um homodímero formado por ponte dissulfeto, conhecida como glutatona oxidada (GSSG). O par GSH/GSSG possui um alto poder redutor e atua como o maior tampão do estado redox celular (LILLIG; BERNDT; HOLMGREN, 2008; ROSE; BODE, 1993). A recuperação da GSSG para seu estado reduzido é feita pela glutatona redutase (GR). A GR é um homodímero formado de subunidades de 52,4 kDa, cada uma com um grupo FAD no seu sítio ativo. A GR catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o FAD, que em

seguida reduz uma ponte dissulfeto intramolecular em seu sítio catalítico. Os grupamentos tiólicos formados reduzem a GSSG regenerando, assim, a GSH. O ciclo da glutatona está representado de maneira simplificada na Figura 3.

A razão GSH/GSSG pode ser utilizada como um marcador do estado redox celular. Modificações neste “potencial redox” estão relacionadas com importantes eventos celulares, entre eles a diferenciação, a proliferação e a morte celular por apoptose (WATSON; CHEN; JONES, 2003). A manutenção do balanço tiol-dissulfeto de proteínas também é em grande parte regulada pela relação GSH/GSSG. Este par redox reage muito lentamente com para ter significância fisiológica, mas enzimas chamadas glutaredoxinas (Grx) podem catalisar essa reação, controlando a oxidação de tióis proteicos (LILLIG; BERNDT; HOLMGREN, 2008). A GSH, ainda, pode ser ligada por pontes dissulfeto gerando dissulfetos mistos (GSH/cisteína da proteína), também denominado S-glutathionilação. Durante eventos de estresse oxidativo, a S-glutathionilação protege os tióis de proteínas contra oxidações irreversíveis, mas é também utilizado pela célula como um mecanismo de sinalização redox (DALLE-DONNE et al., 2007; LILLIG; BERNDT; HOLMGREN, 2008).



**Figura 3. Metabolismo da glutatona.**

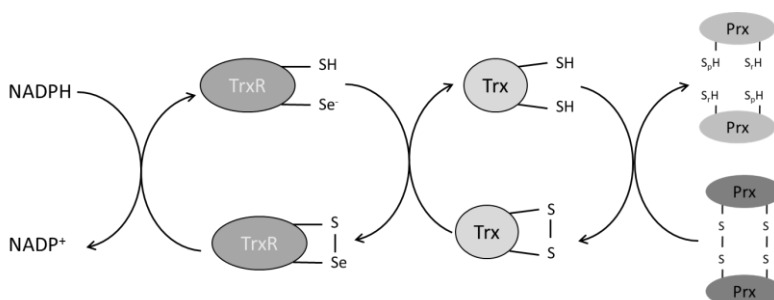
A GSH é utilizada em diversas reações, tais como a detoxificação de xenobióticos (Xe) catalisada pela enzima GST, ou a degradação de peróxidos ( $H_2O_2$ ) catalisada pela GPx, gerando GSSG. O aumento de GSSG leva à S-glutationilação de resíduos de cisteína em proteínas (P-SG), que pode ser revertido pela glutarredoxina (Grx). A GSSG é reduzida pela glutatona redutase (GR) utilizando o NADPH como doador de elétrons. Figura modificada de (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

#### 1.4.4. Sistema da tiorredoxina/peroxirredoxina

A tiorredoxina são proteínas óxido-redutases de cerca de 12 kDa que estão envolvidas em diversos processos celulares, como defesa contra estresse-oxidativo, proliferação e viabilidade celular, geralmente envolvendo trocas tióis-dissulfeto (ARNÉR; HOLMGREN, 2006; HOLMGREN; LU, 2010; LU; HOLMGREN, 2014). A estrutura da Trx apresenta um domínio característico, o “domínio tiorredoxina”, composto de uma sequência de 4 aminoácidos (-Cys-Gly-Pro-Cys-), contendo duas cisteínas estruturalmente próximas em seu sítio ativo. Mamíferos possuem pelo menos três tipos de Trx: a Trx1 é expressa no citosol, a Trx2 na mitocondrial e a spTrx é expressa nos espermatozoides (LU; HOLMGREN, 2014; MAULIK; DAS, 2008).

Assim como o tiol da GSH, aqueles no sítio ativo da Trx são oxidados durante a sua reação, formando uma ponte dissulfeto

intramolecular ( $\text{Trx-S}_2$ ) este é reduzido a forma tiólica pela tiorredoxina redutase (TrxR). Esta é uma flavoproteína homodimérica que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para a Trx (Figura 4). As TrxR de mamíferos são muito parecidas estruturalmente com a GR, porém, além do grupo FAD, as TrxR dependem de uma seleno-cisteína C-terminal para sua ação catalítica. Esta é inserida em um motivo estrutural crítico para o funcionamento da TrxR (HOLMGREN; LU, 2010).



#### Figura 4. Ciclo catalítico da tiorredoxina/tiorredoxina redutase

A tiorredoxina (Trx) é oxidada ( $\text{Trx-S}_2$ ) ao reduzir outras proteínas, formando um dissulfeto intramolecular. A redução deste dissulfeto é catalisada pela TrxR, que depende de uma selenocisteína no seu sítio ativo. NADPH é utilizado como doador de elétrons nessa reação. Figura modificada de (LU; HOLMGREN, 2014)

As peroxiredoxinas (Prx) são uma família de tióis-peroxidases de cerca de 20 kDa que, juntamente com a CAT e GPx, controlam o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  celular, mantendo a homeostasia redox. As Prx utilizam um resíduo de cisteína com alta reatividade ( $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ) em seu sítio ativo denominada de cisteína peroxidática ( $\text{C}_p$ ). Além de serem eficientes na degradação de baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as Prx atua sobre uma diversa gama de outros substratos, como peróxidos orgânicos e peroxinitrito (PARSONAGE; KARPLUS; POOLE, 2008; TRUJILLO et al., 2007).

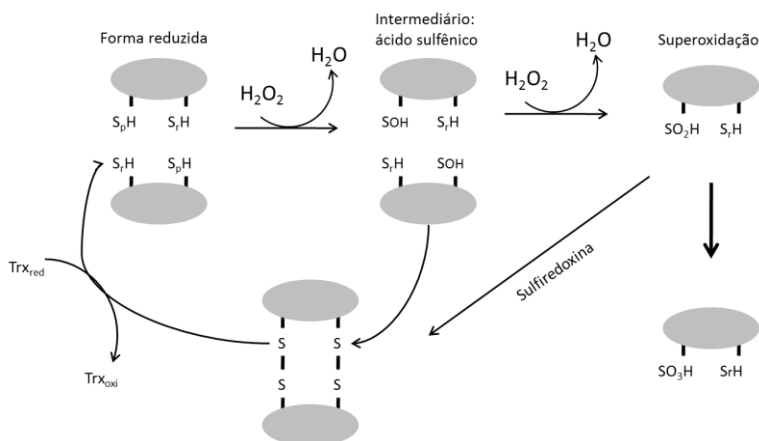
Já foram identificadas isoformas de Prx em todos os filós. Em mamíferos são encontrados 6 isoformas de Prx: A Prx1 e Prx2 são encontradas no citoplasma; a Prx3 na mitocôndria; a Prx-4 está localizada no retículo endoplasmático e no meio extracelular; a Prx5 é encontrada na mitocôndria, no citoplasma, em peroxissomos e no núcleo; e por último, a Prx6 encontra-se no citoplasma (HOFMANN; HECHT; FLOHÉ, 2002; RHEE, 2016; SEO et al., 2000). As Prx podem ser classificadas em dois grupos: 1-Cys e 2-Cys, dependendo do número de cisteínas envolvidas no processo catalítico. As 2-Cys Prx possuem, além da C<sub>p</sub>, uma cisteína de resolução (C<sub>r</sub>). As 1-Cys Prx possuem somente a C<sub>p</sub>. As 2-Cys Prx ainda podem ser divididas em típicas e atípicas, dependendo do mecanismo da ação (PERKINS et al., 2015; TRUJILLO et al., 2007; WOOD et al., 2003).

As Prx costumam ser proteínas abundantes, podendo constituir até de 1-2% das proteínas totais em algumas células. Além disso, as Prx possuem baixo K<sub>M</sub> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (< 20 µM) (CHAE et al., 1999), e por esses motivos essas enzimas são alvos primários do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela célula (PERKINS et al., 2015; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). De fato, estima-se que mais de 90% do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela mitocôndria reaja com a Prx3 (COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010a).

As 2-Cys Prx típicas se apresentam como homodímeros associados não covalentemente, sendo suas subunidades orientadas no sentido inverso, ou seja, a porção N-terminal de uma está voltada para a extremidade C-Terminal da outra (HIROTSU et al., 1999). A reação das Prx com peróxidos (Figura 5) envolve a oxidação da C<sub>p</sub> pelo peróxido, formando ácido sulfênico (-SOH) e liberando água. O ácido sulfênico, então, reage com a C<sub>r</sub> na porção C-terminal da segunda subunidade, formando uma ponte dissulfeto intermolecular e inativando a enzima (SCHRÖDER et al., 2000). A redução da Prx é mediada por uma rápida troca tiól-dissulfeto realizada pela forma reduzida da Trx (WOOD et al., 2003). No caso das 2-Cys Prx atípicas, essas se apresentam como monômeros funcionais, e após a oxidação da C<sub>p</sub> é formada uma ponte dissulfeto intramolecular com a C<sub>r</sub>. Assim como as Prx típicas, as atípicas também tem a Trx como agente redutor (PERKINS et al., 2015). As 1-Cys Prx, no entanto, são reduzidas por diversos agentes tiólicos, incluindo a GSH (PEDRAJAS et al., 2015).

A alta reatividade das Prx se deve, em parte ao baixo pK<sub>a</sub> da C<sub>p</sub> que se encontra em torno de 5, comparado com o pK<sub>a</sub> de ~8 de cisteínas outras proteínas (COX et al., 2009). O baixo pK<sub>a</sub> é resultado da interação da C<sub>p</sub> com um resíduo de arginina que se localiza na vizinhança,

estabilizando a sulfidrila na forma de ânion tiolato. Além disso, outros 2 resíduos conservados de arginina e treonina fazem parte do sítio ativo da enzima. Acredita-se que estes sejam importantes para diminuir a energia de ativação com a molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (PESKIN et al., 2007).



**Figura 5. Ciclo catalítico das peroxirredoxinas**

A Cys peroxidática ( $\text{S}_p\text{H}$ ) é oxidada para a forma de ácido sulfênico ( $\text{SOH}$ ), que é, então, atacado pela Cys de resolução ( $\text{S}_r\text{H}$ ) da outra subunidade. Esta reação forma uma ponte dissulfeto que pode ser reduzida pela tiorredoxina reduzida ( $\text{Trx}_{\text{red}}$ ). A forma oxidada da tiorredoxina ( $\text{Trx}_{\text{oxi}}$ ) pode ser reduzida pela tiorredoxina redutase ( $\text{TrxR}$ ) às custas de NADPH. Quando em excesso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode reagir com o ácido sulfênico gerando ácido sulfínico ( $\text{SO}_2$ ) ou sulfônico ( $\text{SO}_3$ ). A peroxirredoxina- $\text{SO}_2$  pode ser reduzida pela sulfirredoxina. Figura modificada de (POYNTON; HAMPTON, 2014)

Quando há níveis relativamente elevados  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 6), mas ainda não tóxico, o ácido sulfênico pode ser oxidado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando ácido sulfínico ( $-\text{SO}_2$ ) ou sulfônico ( $-\text{SO}_3$ ). Nesse estado de oxidação a  $\text{C}_r$  não pode ser reduzida pela  $\text{Trx}$ , sendo, então, a enzima inativada. A redução do ácido sulfínico até pouco tempo atrás era considerada impossível, porém, foi demonstrado que a superoxidação de 2-Cys Prx é reversível *in vivo*. A enzima denominada sulfirredoxina promove a

redução da forma sulfínica por um processo catalítico complexo e incomum (WOO et al., 2003). Interessantemente, isoformas diferentes de Prx são mais ou menos resistente à oxidação, sugerindo que diferentes Prx possuem diferentes mecanismos de modulação e consequentemente diferentes níveis de controle redox na célula (WOOD; POOLE; KARPLUS, 2003).

Pela sua alta reatividade e abundância, as Prx possuem um importante papel como “sensores” de peróxidos nas células (MADRIGAL-MATUTE et al., 2015; WINTERBOURN; HAMPTON, 2015). Por exemplo, células Jurkat expostas a 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram mais de 50 proteínas oxidadas, porém apenas 2 proteínas (GAPDH e Prx2) se oxidaram com a exposição de 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (BATY; HAMPTON; WINTERBOURN, 2005). Dessa forma, as Prx são ferramentas valiosas no estudo da homeostasia redox. A oxidação dessas enzimas é considerada como um biomarcador do estado redox da célula e pode ser monitorada através de um SDS-PAGE/Western blot em condições não redutoras (redox-western blot). O procedimento é relativamente simples: antes da lise celular é necessário bloquear os tióis livres com agentes alquilantes, como N-etilmaleimida. Este passo é crítico, tendo em vista que as Prx se oxidam rapidamente após a lise, resultando em oxidação artificial (COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010b). No gel de poliacrilamida, a Prx reduzida aparece como um monômero (~22 kDa), enquanto que a forma oxidada por ponte dissulfeto aparece como um dímero (~44 kDa). Em condições fisiológicas, a Prx se encontra em sua maior parte na forma reduzida, mas a exposição das células a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou outros oxidantes, leva a rápida oxidação dessas proteínas, passando para o estado dimérico ou superoxidada, que aparece como um monômero (BROWN; COX; HAMPTON, 2010; COX et al., 2008a; KUMAR et al., 2009; LOW et al., 2007).

Além da função de peroxidases e sensores de peróxido, diversas evidências apontam que as Prx também podem agir como chaperonas, protegendo outras proteínas contra agregação em condições de estresse. Apesar de funcionarem como dímeros, as Prx geralmente são encontradas na forma de decâmeros (pentâmeros de dímeros), octâmeros, dodecâmeros, ou ainda podem se “empilhar”, formando estruturas de alto peso molecular (CAO; LINDSAY, 2017). Essas formas oligoméricas são estabilizadas por diversos estressores como pH (SACCOCCIA et al., 2012), temperatura (TEIXEIRA et al., 2015) e hiperoxidação (JANG et al., 2004), e podem interagir com uma gama de outras proteínas, protegendo-as contra desnaturação e agregação.

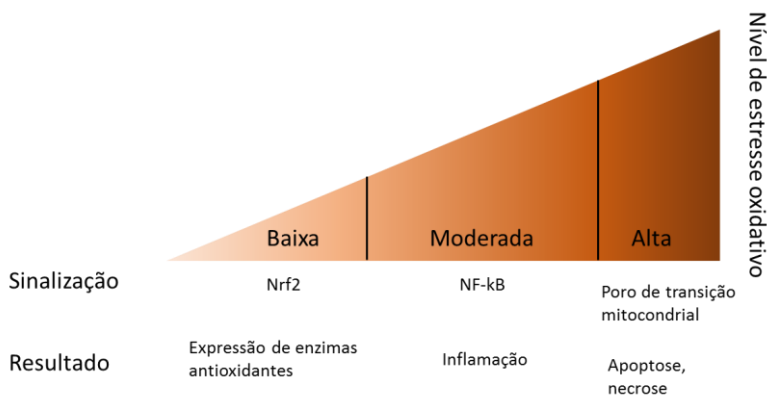


De modo geral, o *knockdown* de peroxiredoxinas deixa as células mais suscetíveis à morte celular por estresse oxidativo, enquanto a sobre-expressão dessas enzimas geralmente confere proteção. Em especial, o *knockdown* da Prx3 por siRNA potencializou a indução de apoptose por TNF- $\alpha$  ou staurosporina (CHANG et al., 2004), enquanto que a sobre-expressão dessa isoforma foi protetora contra hipóxia e agentes oxidantes (NONN; BERGGREN; POWIS, 2003). A oxidação da Prx 3 mitocondrial precede a apoptose, pois acontece antes da liberação de citocromo C pela mitocôndria (COX et al., 2008a). Em outro trabalho, o mesmo grupo demonstrou que a inibição da TrxR por auranofina causa forte oxidação da Prx3, o que indica que essa oxidação pode ser um processo inicial na apoptose. Estes eventos ocorrem antes de qualquer alteração nos marcadores citoplasmáticos de estresse oxidativo, incluindo a oxidação das Prx1 e Prx2 (COX et al., 2008b). A inibição TrxR pela auranofina provoca apoptose dependente da mitocôndria por um mecanismo envolvendo Bax/Bak e a oxidação da Trx e Prx3 (COX et al., 2008a; ZHANG et al., 2014). Outro trabalho mais recente demonstrou que a inibição da TrxR pela auranofina resulta na oxidação da enzima “Ciclofilina D”. Esta é uma importante proteína reguladora de diversos processos que levam a produção de ERO, incluindo a regulação do poro de transição de permeabilidade e a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria (FOLDA et al., 2016). Assim, fica clara a importância das Prx, tanto para a proteção e como para a morte celular.

#### **1.4.6. Peroxirredoxinas na manutenção do estado redox e função celular**

As ERO são reconhecidas como importantes moduladores da função celular, controlando a atividade de diversas proteínas por regulação redox. Por causa de seu alto tempo de meia vida, alta taxa de difusão e relativa especificidade, o  $H_2O_2$  é a ERO mais importante na modulação redox (POOLE; KARPLUS; CLAIBORNE, 2004; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). A modulação de diversos fatores de transcrição por  $H_2O_2$  já é conhecida, sendo que concentrações baixas a moderadas podem controlar eventos como a expressão de proteínas e inflamação, enquanto que altas concentrações podem induzir apoptose ou outros tipos de morte celular (Figura 6) (BRIGELIUS-FLOHE; FLOHE, 2011; CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015; GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). Talvez o melhor exemplo de regulação redox seja a ativação do fator de transcrição Nrf2 (do Inglês *Nuclear factor*

(*erythroid-derived 2)-like 2*) por oxidantes. Normalmente, o Nrf2 se encontra no citosol ligado com seu inibidor Keap1 (do Inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), que constantemente marca o Nrf2 para a degradação através da ubiquitinação. Quando o Keap1 é oxidado por substâncias eletrofílicas, a interação Nrf2-Keap1 se desfaz e o Nrf2 passa a não ser mais ubiquitinado, permitindo seu acúmulo e translocação para o núcleo. No núcleo, o Nrf2 se liga aos elementos de resposta antioxidante, aumentando a expressão de diversas enzimas antioxidantes e de defesa celular (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015; GACESA et al., 2016).

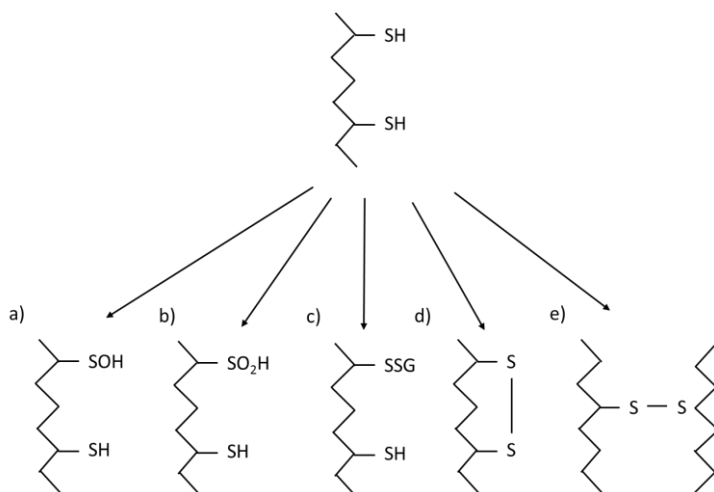


### Figura 6. Sinalização celular por $H_2O_2$ .

O  $H_2O_2$  pode controlar diversos processos celulares. Em baixas concentrações ativam o fator de transcrição Nrf2, levando a expressão de enzimas antioxidantes. Concentrações moderadas de  $H_2O_2$  podem regular o fator de transcrição NF-kB, ativando processos inflamatórios, enquanto altas concentrações de  $H_2O_2$  podem induzir a abertura dos poros de transição mitocondrial, levando à apoptose ou necrose. Figura adaptada de (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006).

Por ser um dos aminoácidos mais reativos, a cisteína possui um papel central na modulação redox. Sua oxidação pode resultar em ácido sulfênico ou sulfônico, disulfetos intra e intermoleculares, glutationilação, nitrosilação, entre outros (Figura 7). Como consequência, modificações na estrutura e função proteica são eventos comuns. Estima-se que cerca de 20.000 cisteínas do genoma humano sejam expressas, e cerca de 10-

20% destas possuem baixo pKa, sendo muito reativas e sensíveis a oxidação (JONES, 2008). A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP-1B), por exemplo, é prontamente inativada por  $H_2O_2$  pela oxidação de tióis em sua superfície, e acredita-se que este mecanismo module a sinalização por fatores de crescimento (DAGNELL et al., 2013; FRIJHOFF et al., 2014). No entanto, os mecanismos pelos quais essas oxidações ocorrem ainda não foram elucidados, tendo em vista que, mesmo apresentando baixo pKa, estas cisteínas reagem muito mais lentamente com  $H_2O_2$  do que a Prx e GPx. Assim, as cisteínas da PTP-1B não conseguiriam competir com as peroxidases pela reação com  $H_2O_2$  (WINTERBOURN, 2008).



**Figura 7. Modulação do estado redox dos tióis em proteínas.**

A oxidação de tióis em proteínas pode resultar na formação de ácido sulfinico (a), sulfônico (b), glutationilação (c) dissulfetos intra (d) ou intermoleculares (e), entre outros. Modificado de (DALLE-DONNE et al., 2007).

Atualmente, existem 2 hipóteses não excludentes de como o  $H_2O_2$  poderia competir com as peroxidases para mediar a regulação de tióis proteicos, tendo as Prx como mediadores centrais. A primeira foi

introduzida por Wood e colaboradores e chamada de “floodgate hypothesis”. Essa hipótese propõe que um aumento na concentração de  $H_2O_2$  em um compartimento celular poderia levar a superoxidação de Prx, inibindo a enzima e permitindo acúmulo transitório e localizado de peróxido (WOOD; POOLE; KARPLUS, 2003). Qualquer difusão do  $H_2O_2$  fora dessa área seria rapidamente controlado pela GPx e CAT, impedindo danos para a célula, mas permitindo que o  $H_2O_2$  atingisse concentrações altas o suficiente para oxidar tióis de proteínas perto do local onde as Prx estão inibidas. A baixa taxa de reciclagem das Prx pela sulfiredoxina também garante mais tempo para que o  $H_2O_2$  consiga exercer sua função modulatória. Esse mecanismo já foi identificado em bactérias através da regulação do fator de transcrição OxyR, mas ainda não existem muitos exemplos desse processo em eucariotos (ASLUND et al., 1999).

Outra hipótese é a de que as Prx possam agir não só como sensores de peróxido, mas como transmissores de equivalentes oxidativos. Um exemplo desse mecanismo foi identificado em *S. cerevisiae*. Quando a peroxidase Orp1, uma Prx, é oxidada por  $H_2O_2$ , esta forma uma ponte dissulfeto intermolecular com o fator de transcrição Yap1, que posteriormente se rearranja em um dissulfeto intramolecular no Yap1, levando à redução da Orp1. O Yap1 oxidado fica, então, retido no núcleo aonde ativa a transcrição de seus genes-alvo (DELAUNAY et al., 2002). Desde então, diversas evidências sugerem que esse seja um mecanismo presente na modulação de diversas vias. A Prx1, por exemplo, pode formar um dissulfeto intermolecular com a proteína cinase ASK1 (do Inglês *apoptosis signaling kinase 1*), levando à oxidação dessa proteína que por sua vez leva a fosforilação da cinase p38, culminando em morte celular por apoptose (JARVIS; HUGHES; LEDGERWOOD, 2012). Interessantemente, a Trx também pode se ligar ao ASK1, e assim modular sua atividade. Mais recentemente, a transmissão de equivalentes oxidantes também foi observada entre a Prx2 e o fator de transcrição STAT3 (SOBOTTA et al., 2014). Dessa forma, um número crescente de evidências aponta um papel central das Prx no controle de diversas vias de sinalização redox celular.

Nesta tese, estudamos a modulação redox das peroxirredoxinas sob duas situações: num primeiro momento, correlacionamos a oxidação dessas proteínas em células cancerígenas expostas a um modulador dos sistemas da Trx/Prx; e em um segundo trabalho analisamos a oxidação dessas proteínas em células inflamatórias durante o *burst* oxidativo.

## 1.5. Justificativa

Desde a descoberta da SOD por McCord e Fridovitch (MCCORD; KEELE; FRIDOVICH, 1971), as espécies ERO são reconhecidas como importantes mediadores de processos biológicos. No entanto, diversas descobertas nos últimos 20 anos forçaram uma grande reformulação no entendimento da importância das ERO na função e morte celular. Pequenas alterações no ambiente redox da célula podem trazer grandes consequências para a função celular. Assim, o uso de marcadores clássicos de estresse oxidativo, como carbonilação de proteínas e lipoperoxidação, apesar de úteis para detectar danos nas estruturas celulares, não são mais suficientes para a compreensão completa desses processos. Os sistemas da GSH e Trx são os principais centros de controle dos processos redox na célula e, dessa forma, estudos que mostrem como a interação entre as ERO e esses dois sistemas modulam a função e morte celular são necessários. Por causa de sua grande sensibilidade, o uso das Prx como marcador da quebra da homeostasia redox celular tem se mostrado uma ferramenta fundamental nesses estudos.

Diversas doenças, como o câncer e inflamação, possuem uma forte ligação com ERO. A proliferação descontrolada de células cancerígenas já foi associada com a produção de ROS, e a expressão de Prx está aumentada em diversos tipos de cânceres (PARK et al., 2016). Novas evidências ainda apontam que a modulação dos sistemas GSH/Trx induzem a morte de diversas células cancerígenas. A secreção de Prx também já foi observada tanto por células cancerígenas como por células inflamatórias e acredita-se que esse evento possa ter importantes implicações para o controle da inflamação (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

Diversas perguntas ainda precisam ser elucidadas para entendermos a participação das ERO nessas patologias. Qual é a participação das diferentes peroxidases na proteção e função celular? Qual são as consequências da oxidação de Prx no controle da morte celular? Como as ERO e as peroxidases interagem em células do sistema imune para controlar a inflamação? Este trabalho foca no metabolismo da GSH/Trx para contribuir com o esclarecimento dessas perguntas.

## 2. Objetivos

### Objetivo geral

Investigar a modulação redox das peroxirredoxinas e a participação dos sistemas da GSH e da Trx na proteção e função celular.

### Objetivos específicos

*Estudo 1: Avaliar os efeitos de um inibidor da GR e TrxR (2-AAPA) sobre a viabilidade celular e metabolismo redox de células A172 derivadas de glioma humano.*

- Investigar se a inibição da GR por 2-AAPA diminui a capacidade de detoxificação de peróxidos pelas células e aumenta a vulnerabilidade dessas células a peróxidos.
- Investigar se 2-AAPA afeta os sistemas Trx/TrxR
- Analisar se o tratamento com 2-AAPA modula o estado redox das Prx.
- Verificar se o possível desbalanço redox causado por 2-AAPA afeta a função mitocondrial das células.

*Estudo 2: Investigar a modulação redox das Prx durante o burst oxidativo em células HL60 diferenciadas em neutrófilos.*

- Avaliar o estado basal de oxidação da Prx1, Prx2 e Prx3
- Avaliar se a indução do *burst oxidativo* por um estimulador farmacológico ou através da exposição a bactérias é capaz de modular o estado redox das Prx
- Investigar se o estado redox das Prx é dependente da atividade da NADPH oxidase.
- Identificar a possível importância da modulação redox das Prx na função dos neutrófilos.

### **3. Papel do 2-AAPA, um conhecido inibidor da enzima glutathione redutase, sobre o estado redox e degradação de peróxidos em células A172 derivadas de glioma humano.**

#### **3.1. Introdução**

Os tióis celulares estão entre os alvos principais das ERO, e consequentemente estão no centro de todos os processos redox celulares (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). A oxidação de tióis de proteínas por trocas tióis/disulfeto ou outros processos, pode resultar em formação de disulfetos intra- ou inter-moleculares e perda de função. Dessa forma, a homeostasia dos tióis celulares é crítica para a sobrevivência e função celular (NETTO et al., 2016; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). O interior celular se apresenta como um ambiente muito redutivo. A maioria das biomoléculas são mantidas em sua forma reduzida. Por outro lado, dissulfetos e outros produtos de oxidação são mantido em baixos níveis pelos sistemas antioxidantes celulares. A redução de dissulfetos é principalmente realizada por dois sistemas redutores dependentes de tióis: o sistema da GSH e o da Trx (COUTO; WOOD; BARBER, 2016; HOLMGREN; LU, 2010).

Apesar dos mecanismos ainda não estarem muito bem elucidados, a literatura apresenta um grande número de evidências sugerindo que os distúrbios no metabolismo redox dos tióis celulares estão ligados à diversas condições patológicas (VALKO et al., 2007). Desta forma, o estudo da fisiopatologia de diversas doenças depende de drogas capazes de modular os sistemas antioxidantes e o ambiente redox celular. Estudos sobre a biologia do câncer deixa isso evidente, mostrando que a formação e resistência do câncer está intimamente ligada com formação de ERO e o metabolismo antioxidante (HARRIS et al., 2015; SCARBROUGH et al., 2012). A inibição farmacológica da GR ou TrxR, por exemplo, pode aumentar a sensibilidade de células cancerígenas para diversas drogas e para raios X (HARRIS et al., 2015; SCARBROUGH et al., 2012; TANAKA et al., 2016; ZHAO et al., 2009b). Além disso, a Prx1 pode ter uma função antitumoral, em contraste com o papel da Prx2, que aumenta a resistência de alguns tipos de cânceres (LU et al., 2014; PARK et al., 2016).

Diversas abordagens são usadas para o estudo do metabolismo redox celular, que incluem o *knockdown* de enzimas antioxidantes

(CRACK et al., 2001; ZHANG et al., 2014) ou o uso de drogas que modulem o sistema antioxidante celular. Entre as drogas mais comumente empregadas para este fim estão aquelas que conseguem depletar a GSH celular, como 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ou butionina sulfoxamina (BSO) (SCARBROUGH et al., 2012; TREVISAN et al., 2014), ou aquelas que inibem enzimas como a GR ou TrxR, impedindo a reciclagem da GSSG e Trx-S<sub>2</sub> para suas formas reduzidas, GSH e Trx, respectivamente. A carmustina (BCNU), um inibidor da GR, é comumente utilizado como uma ferramenta para estudar a participação da GSH na proteção e morte celular. Entre os efeitos relatados pela administração dessa droga, encontram-se o aumento do conteúdo de GSSG e produção de ERO (HAN et al., 2006; MITOZO et al., 2011; RIGOBELLO et al., 2005). Da mesma forma, a auranofina, um inibidor da TrxR, é uma droga empregada para o estudo do sistema da Trx. Interessantemente, trabalhos recentes sugerem que a auranofina tem um grande potencial para auxiliar no tratamento de câncer, induzindo oxidação da Trx e apoptose em diversos tipos de células cancerígenas (COX et al., 2008a; DU et al., 2012; MARZANO et al., 2007). Além disso, a auranofina já foi aprovada pelo *National Institute of Health* (EUA) como um agente antirreumático, o que facilita os estudos clínicos e seu possível uso na terapia contra o câncer (RODER; THOMSON, 2015). Interessantemente, a inibição conjunta dos sistemas de regeneração da GSH e da Trx são mais eficientes que a inibição de apenas um dos dois sistemas em induzir a morte de células cancerígenas (HARRIS et al., 2015; TANAKA et al., 2016).

**2-AAPA** (2-acetylaminio-3-[4-(2-acetylaminio-2-carboxyethylsulfanyl-thiocarbonylamino) phenylthiocarbamoylsulfanyl]propionic acid) é uma nova droga capaz de inibir irreversivelmente a GR através da tiocarbamoilação dos seu tióis catalíticos (SEEFELDT et al., 2009). Por causa de sua grande eficiência comparando com outros inibidores da GR ( $K_i = 56 \mu\text{M}$  contra  $\text{IC}_{50} = 647 \mu\text{M}$  para o BCNU), diversos trabalhos recentes vêm usando esta droga para estudar o metabolismo da GSH (DAMGAARD et al., 2016; ZHAO et al., 2009b). 2-AAPA leva ao acúmulo de GSSG, aumenta a oxidação de tióis e glutationilação de proteínas em cultivo de células (XIE et al., 2014; ZHAO et al., 2009a).

Apesar dos diversos estudos terem apontando os efeitos do tratamento com 2-AAPA sobre os tióis celulares, a toxicidade dessa droga ainda não foi muito explorada. Neste trabalho, analisamos a toxicidade do 2-AAPA em células A172, derivadas de glioblastoma humano.



Avaliamos a função mitocondrial, o estado redox da Prx1, Prx2, e Prx3, e a capacidade destas células em degradar peróxidos, e a correlação com sua sensibilidade à peróxidos.

## 2.2. Materiais e métodos

### 2.2.1 Cultura celular e análise de viabilidade

Células derivadas de glioblastoma humanos A172 foram cultivadas e repicadas em meio DMEM-F12 (Gibco, 12400-16) suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), e mantidas em ambiente úmido contendo 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

A viabilidade celular foi avaliada pela capacidade de reduzir o sal MTT (do Inglês *3-(4,5)-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (MOSMANN, 1983). 8 x 10<sup>3</sup> células foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 h antes dos ensaios. As células foram tratadas como indicado na legenda das figuras, e após o tempo determinado o meio de incubação foi aspirado e uma solução de MTT (0,5 mg/ml em *Hanks balanced salt solution* (HBSS), 100 µl/poço) foi adicionada e as células incubadas por 1 h à 37°C. A solução foi então aspirada e o formazan formado foi solubilizado com a adição de 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e absorbância medida à 550 nm.

### 2.2.2 Atividade de enzimas antioxidantes

Células A172 foram semeadas em frascos T-25 mm e incubadas por 24 h antes dos ensaios. Após 30 min de incubação com 2-AAPA, as células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 com 1% CHAPS e inibidores de proteases. Os lisados foram incubados em gelo por 15 min, sendo misturadas a cada 5 min com agitador tipo vórtex. As amostras foram, então, centrifugadas por 10 min à 15.000 x g, à 4°C e o sobrenadante usado para as leituras.

A atividade da GR foi medida pela oxidação de NADPH na presença de GSSG, como descrito anteriormente (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). As amostras foram adicionadas a um meio reacional contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. A reação catalisada pela GR é iniciada pela adição

de 1 mM GSSG, consumindo NADPH ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) que pode ser acompanhado em espectrofotômetro à 340 nm por 5 min.

A atividade da TrxR foi medida acompanhando a oxidação do DTNB dependente de NADPH (ARNÉR; ZHONG; HOLMGREN, 1998). As amostras foram adicionadas a uma solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e 0,2 mg/mL de BSA. A mistura foi incubada por 5 min para estabilizar a reação dos tióis livres com o DTNB presente no meio. Então, foi adicionado NADPH (0,2 mM) e a reação foi acompanhada à 412 nm por 5 min. A diferença na velocidade da reação antes e depois da adição do NADPH foi usada para expressar a atividade da TrxR.

A proteína total nas amostras foi medida pelo método de Bradford usando-se albumina de soro bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

### 2.2.2. Consumo de peróxido

Para os experimentos de consumo de peróxido, células A172 foram semeadas em placas de 24 poços à uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço e incubadas por 24h antes do ensaio. As células foram tratadas pela adição de 2-AAPA ao meio de cultura e mantido por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e adicionado meio HEPES (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25 mM HEPES, pH 7,4, 12 mM glucose, and 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) contendo 80  $\mu\text{M}$  de peróxido de cumeno (CHP) ou 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uma alíquota de meio de cultura foi retirada nos tempos indicados na legenda das figuras e a concentração restante de peróxido no meio foi quantificado usando-se o método do xilenol laranja (GAY; GEBICKI, 2002). As alíquotas contendo amostras do peróxido foram incubadas em um meio contendo 110 mM de ácido perclórico, 250  $\mu\text{M}$  xilenol laranja e 250  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  por 30 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida à 560 nm e comparada a uma curva padrão feita com o peróxido correspondente.

### 2.2.3 Western blot

Para medir o estado de oxidação das Prxs, as células A172 foram semeadas em placas de 6 poços com uma densidade de  $0,35 \times 10^6$  células/poço e incubadas por 24 h antes dos experimentos. Após a

incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 20 min a temperatura ambiente com uma solução de 100 mM de N-etil maleimida (NEM) para alquilar os tióis livres. A solução de NEM foi feita em PBS e previamente tratada com catalase (10 µg/ml) para eliminar o peróxido residual da solução (COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010b). Após a incubação, o meio foi aspirado e as células foram, então, raspadas após a adição de uma solução de lise (Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 1% NP-40, Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 0,5 mM e coquetel de inibidores de proteases). O material insolúvel foi precipitado por centrifugação (20.000 g por 15 min à 4°C) e o sobrenadante foi coletado e misturado com tampão laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 0.025% de azul de bromofenol). As proteínas foram então separadas por SDS-PAGE em gel de 12% (20 µg/poço) e transferidas para uma membrana de PVDF. O bloqueio foi realizado com leite desnatado (5%) por 1 h a temperatura ambiente, e as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos contra Prx1 (Millipore, 1:5000), Prx2 (Abcam, 1:5000), Prx3 (Abcam, 1:10000). As imagens foram reveladas usando-se técnicas de quimioluminescência padrão e obtidas com um fotodocumentador Chemidoc (BioRad, La Jolla). A quantificação das bandas foi feita usando-se o software Image Lab (BioRad, La Jolla).

#### 2.2.4. Função mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi medido através do método do *tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate* (TMRE). TMRE é um corante catiônico permeável que se acumula em mitocôndrias ativas, porém mitocôndrias despolarizadas são incapazes de reter o corante. Assim, a intensidade do sinal de fluorescência do corante pode ser usado como um marcador do potencial de membrana mitocondrial (COX et al., 2008a). Células A172 foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço e incubadas por 24 h antes do ensaio. As células foram tratadas como descrito na legenda das figuras, e o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS e incubadas por 20 min com uma solução HBSS contendo TMRE (500 nM). Após a incubação as células foram lavadas com PBS e a fluorescência medida: excitação 550 e emissão 580 nm.

A capacidade respiratória mitocondrial foi analisada por respirometria de alta resolução (Oroboros Oxygraph-O2K, Austria).

Células A172 foram semeadas em placas de petri de 60 mm por 24 h antes dos ensaios. Após a incubação com 2-AAPA, as células foram removidas com o uso tripsina, e centrifugadas por 3 min a 1.200 g. As células foram, então, adicionadas ao meio DMEM, sem soro fetal bovino. As células foram contadas usando um hemocítômetro e  $1,5 \times 10^6$  células em 2 ml foram adicionadas à câmara do aparelho. O fluxo de oxigênio (pmol  $O_2$ /s/ $10^6$  células) foi medido à 37°C usando-se o software DatLab (Ouroboros instruments, Austria). Após análise da respiração basal, a enzima ATP sintase foi inibida pela adição de oligomicina (1 µg/ml), determinando-se, assim, a respiração acoplada à produção de ATP. A respiração máxima foi analisada pela titulação com o desacoplador mitocondrial *carbonyl cyanide 4(trifluoromethoxy)phenylhydrazone* (FCCP). Após análise da respiração máxima, a cadeia transportadora foi interrompida pela inibição do complexo 3 pela adição de antimicina A (1 µg/ml). O fluxo de oxigênio restante foi considerado como respiração extra mitocondrial.

#### 2.2.5. *Glutathiona total, tióis não proteicos e tióis protéicos.*

Células A172 foram semeadas em frascos T-25 com uma densidade de  $0,75 \times 10^6$  células/frasco e incubadas por 24 h antes dos experimentos. Após tratamento com 2-AAPA, as células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7.0 com 1% CHAPS. Uma alíquota foi coletada para quantificação de proteínas, e ao restante foi adicionado ácido perclórico (0,5 M) para precipitar proteínas. As amostras foram centrifugadas por 5 min à 15.000 x g, à 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a análise de glutathiona total (GSH-t) e tióis não protéicos (NPSH). O precipitado foi dissolvido em hidrócloro de guanidina para a análise dos tióis protéicos (PSH).

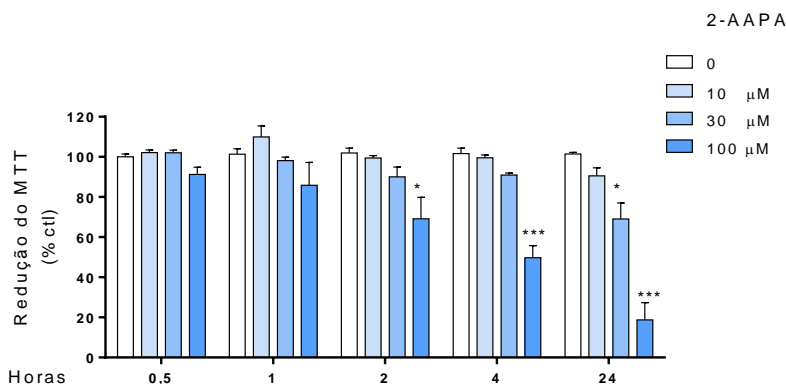
NPSH e PSH foram medidos pela reação espontânea dos tióis com DTNB (ELLMAN, 1959). Amostras foram misturadas com uma solução contendo TRIS/HCl (0,5 M), pH 8, e DTNB (0.2 mM) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida à 412 nm e comparada com uma curva padrão usando-se concentrações conhecidas GSH.

A GSH-t, compreendendo a soma GSH mais GSSG, foi medida pelo método enzimático descrito por Tietze (TIETZE, 1969). As amostras foram neutralizadas com tampão fosfato 0,1 M e adicionadas à um meio

reacional contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,1 mM DTNB e 0,05 unidades de GR. A taxa de formação de TNB foi acompanhada à 412 nm por 5 min e comparadas com uma curva padrão feita com GSH.

### **2.3. Resultados**

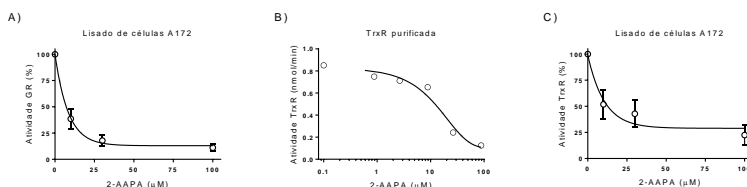
Primeiramente analisamos a viabilidade de células A172 expostas ao 2-AAPA (10, 30 ou 100  $\mu$ M). Como mostrado na Figura 8, a redução do MTT foi diminuída com um perfil concentração e tempo dependente, indicando a toxicidade do 2-AAPA. Nenhuma toxicidade foi observada na concentração de 10  $\mu$ M e nas 24 h de incubação. A incubação com 2-AAPA 30  $\mu$ M, no entanto, foi capaz de diminuir a viabilidade das células em 30% após 24 h. A concentração de 100  $\mu$ M se mostrou bastante tóxica para as células, já perceptível após 2 h de incubação. Vinte e quatro horas após o tratamento com 2-AAPA 100  $\mu$ M, as células apresentavam menos de 20% da viabilidade, quando comparadas com o grupo controle.



**Figura 8. Análise concentração e tempo-resposta da viabilidade celular de células tratadas com 2-AAPA.**

As células foram tratadas com 2-AAPA (10, 30 ou 100  $\mu\text{M}$ ) por diferentes tempos e a viabilidade celular foi analisada pela redução do MTT. Dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ) e apresentadas como percentagem do grupo controle. Diferenças estatísticas foram calculadas pela ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Bonferroni. As diferenças de seus respectivos grupos controles estão indicadas por \* $p<0.05$  or \*\*\* $p<0,001$ .

Para entender os mecanismos relacionados à indução de morte celular por 2-AAPA, as células A172 foram tratadas com este composto por 30 min e a atividade das enzimas GR e TrxR foram analisadas, como descrito nos materiais e métodos. A concentração de 2-AAPA necessária para inibir 50% da atividade da enzima ( $\text{IC}_{50}$ ) foi 6.7  $\mu\text{M}$  para a GR (Fig. 9A). Como a inibição da TrxR por 2-AAPA não foi muito explorada, decidimos calcular o  $\text{IC}_{50}$  para a proteína purificada, e verificamos ser aproximadamente 17  $\mu\text{M}$  (Fig. 9B). Nas células, a TrxR também foi inibida, com um  $\text{IC}_{50}$  de aproximadamente 8,7  $\mu\text{M}$  (Fig. 9C). Assim, observamos que, para essas células, o 2-AAPA em baixas concentrações é capaz de inibir ambas enzimas.



**Figura 9. 2-AAPA é um potente inibidor da atividade da GR e TrxR.** (A) atividade da GR em lisado de células A172, (B) atividade TrxR de uma amostra de proteína purificada (0,3 U/ml) e (C) atividade da TrxR em lisado de células A172. Células A-172 foram tratadas por 30 min com a presença da concentração indicada de 2-AAPA no meio de cultura. As atividades enzimáticas foram analisadas como descrito em materiais e métodos. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n=3).

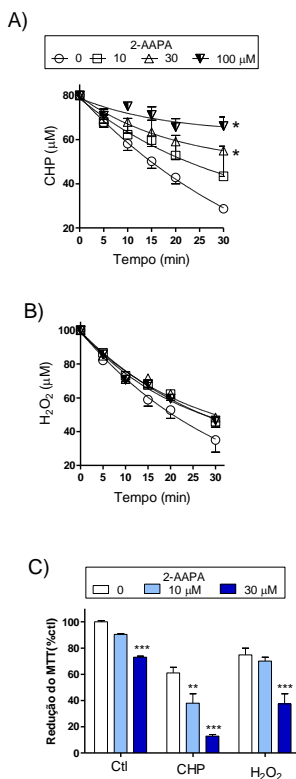
A degradação de peróxidos nas células é mediado pela ação de diversas peroxidases, sendo que várias dessas dependem do poder redutor da GSH e Trx (DRECHSEL; PATEL, 2010; LIDDELL et al., 2006). Já como o tratamento com 2-AAPA inibiu as duas tióis redutases (GR e TrxR), decidimos avaliar se o consumo de peróxidos pelas células A172 estava comprometido. Uma menor capacidade em degradar peróxidos pode resultar em maior dano celular em situações de estresse oxidativo. Para isso, as células A172 foram pré-incubadas por 30 min com 2-AAPA, e posteriormente expostas à CHP (80  $\mu$ M) ou  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) e a taxa de eliminação destes peróxidos analisada. As células controle eliminaram  $\sim 50\%$  do CHP nos primeiros 15 min de incubação, atingindo uma taxa de  $1.97 \pm 0.20 \mu\text{mol/min}/10^5$  células (Fig. 10A). Em contraste, a eliminação do CHP pelas células foi diminuído na medida em que a concentração do 2-AAPA foi aumentando (10  $\mu$ M =  $1.32 \pm 0.50$ , 30  $\mu$ M =  $1.06 \pm 0.36$  e 100  $\mu$ M =  $0.52 \pm 0.18 \mu\text{mol/min}/10^5$  cells).

As células A172 metabolizaram  $H_2O_2$  mais rapidamente que o CHP ( $2.65 \pm 0.23 \mu\text{mol/min}/10^5$  nas células controle). Em contraste com o CHP, o tratamento com 2-AAPA não alterou a taxa de eliminação de  $H_2O_2$  em nenhuma das concentrações testadas, indicando a participação de outras peroxidases na eliminação deste peróxido, como a CAT.

Já como o tratamento das células com 2-AAPA diminuiu significativamente a habilidade das células em degradar CHP, testamos se as células estariam mais vulneráveis à toxicidade causada pelos peróxidos. Para tanto, após a pré-incubação com 2-AAPA, as células foram incubadas por 24 h com  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) ou CHP (40  $\mu$ M), e a

viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT. O próprio pré-tratamento com 2-AAPA 10  $\mu$ M ou 30  $\mu$ M diminuiu a viabilidade em 10 e 23%, respectivamente. Somente na presença de CHP houve uma diminuição de 39% na viabilidade celular (Fig. 10C). O tratamento concomitante de 2-AAPA e CHP apresentou um efeito sinérgico, aumentando a morte celular. Isto indica que houve um maior prejuízo quando as células foram pré-tratadas com 2-AAPA, indicando que a menor eliminação de CHP leva a um maior comprometimento da viabilidade celular. O  $H_2O_2$  sozinho, sem pré-tratamento com 2-AAPA, promoveu uma diminuição de 25% na viabilidade celular, porém não houve sinergismo pelo pré-tratamento com o 2-AAPA. Isto concorda com os dados mostrando que o tratamento com 2-AAPA não afeta a degradação de  $H_2O_2$ , e portando a combinação de 2-AAPA apresenta apenas um efeito aditivo sobre a viabilidade celular.

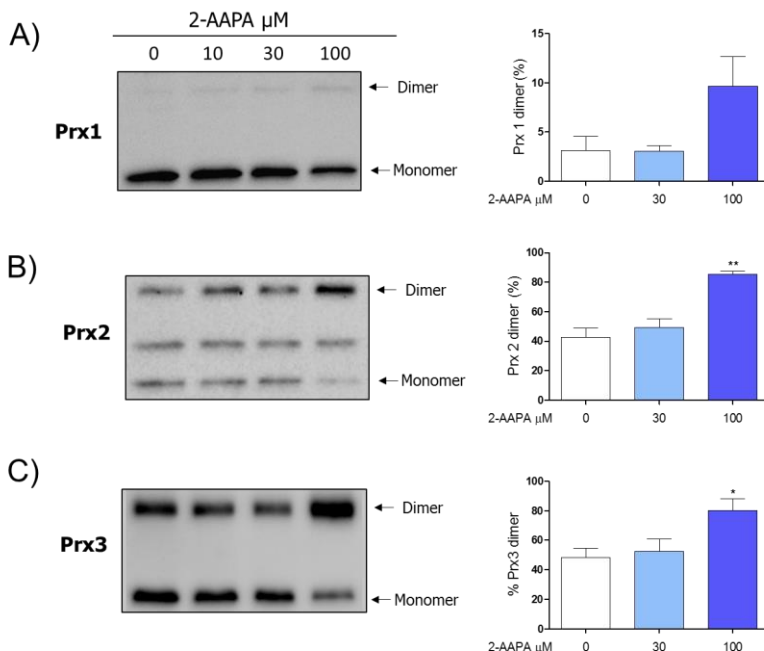




**Figura 10. Diminuição da taxa de eliminação de peróxidos pelo tratamento com 2-AAPA.**

Células A172 foram pré-tratadas com 2-AAPA por 30 min, lavadas e então expostas a (A) CHP 80 μM ou (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM. A concentração de peróxidos restante no meio foi medida pelo método do xilenol laranja, nos tempos indicados, como descrito em materiais e métodos. A taxa aparente de consumo foi calculada baseada na regressão linear dos dados até 15 min. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (sem 2-AAPA) são indicadas por \*  $p < 0.05$ . (C) Células A172 foram pré-tratadas com 2-AAPA por 30 min, expostas à 40 μM de CHP ou 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h e a viabilidade celular analisada pelo método da redução do MTT. Dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Diferenças estatísticas relativo ao grupo controle foram por detectadas pela ANOVA de duas vias seguidas pelo teste *post hoc* de Bonferroni, e indicadas como \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

As Prxs possuem cisteínas muito reativas e, por esse motivo, sua oxidação serve como eficiente marcador de estresse oxidativo (Poynton and Hampton, 2014). Como mostrado na Figura 10, a TrxR foi inibida pela exposição ao 2-AAPA e, sendo assim, uma menor reciclagem de Trx também pode comprometer a redução da C<sub>p</sub> da Prx, a qual é oxidada à dissulfeto durante seu ciclo catalítico. Com isso, é esperado que a atividade Prxs também seja prejudicada, devido ao acúmulo de Prx oxidada (COX et al., 2008a). Sendo assim, analisamos o estado de oxidação das isoformas citoplasmáticas das Prx (Prx 1 e Prx 2), assim como a isoforma mitocondrial, Prx3, nas células A172. A Prx1 se encontra quase totalmente reduzida nas células controle, apresentando-se somente em torno de 5% na forma de dímero (Fig. 11A). Entretanto, este valor praticamente triplicou pelo tratamento de 2-AAPA 100 µM. Tanto a Prx2 quanto a Prx3 apresentavam cerca de 40-50% na forma de dímeros em condições basais (Fig. 11B e C). Como no caso da Prx1, o tratamento com 2-AAPA 100 µM por 30 min dobrou o nível de oxidação dessas isoformas. Assim, podemos concluir que 2-AAPA na concentração de 100 µM leva a uma oxidação acentuada das Prxs nas células A172, indicando comprometimento da atividade da TrxR. Estes dados indicam que a oxidação da C<sub>p</sub> durante o ciclo catalítico não foi reduzida aos níveis basais, sugerindo a presença de estresse oxidativo.

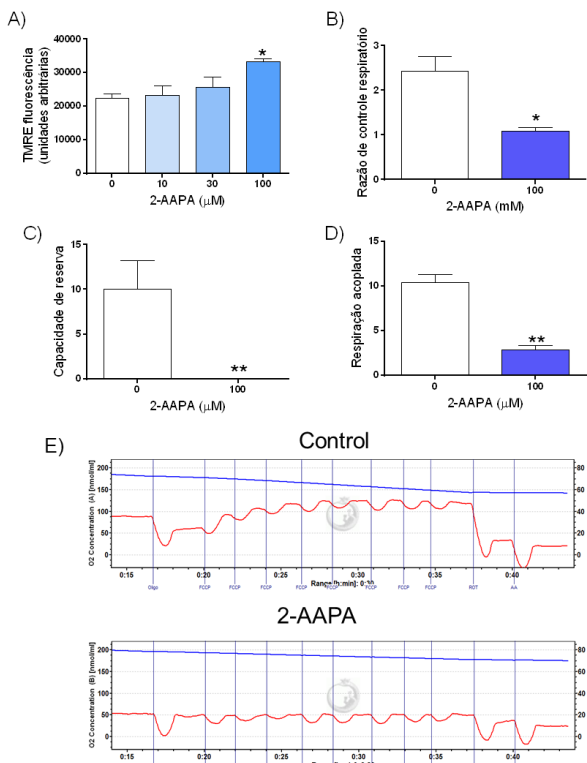


**Figura 11. 2-AAPA leva à dimerização das peroxiredoxinas em células A172.**

Imagens representativas de Western blots não redutores apresentando o estado de oxidação (dimerização) das Prx1 (A), Prx2 (B) e Prx3 (C) após tratamento com 2-AAPA por 30 min. Gráficos estão apresentando os resultados semi-quantitativos de 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram calculadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet e indicadas por \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

Após verificarmos que a Prx3 estava sendo oxidada pelo tratamento com 2-AAPA, decidimos verificar se a função mitocondrial também estava comprometida, já que a oxidação dessa proteína tem sido implicada na morte celular e apoptose (COX et al., 2008b; HAMPTON; CONNOR, 2016). O tratamento das células com 2-AAPA por 30 min induziu hiperpolarização da membrana mitocondrial (Fig. 12A), mas

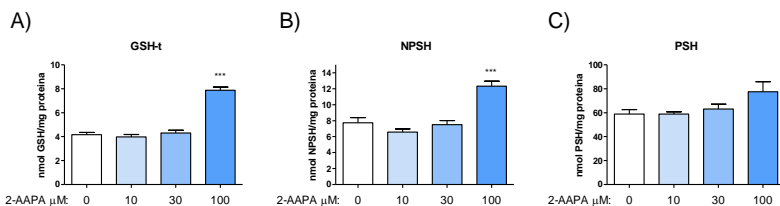
somente na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Em seguida, analisamos a função mitocondrial por respirometria de alta resolução. Os parâmetros de taxa de controle respiratório (Fig. 12B), capacidade de reserva (Fig. 12C) e a respiração acoplada à produção de ATP (Fig. 12D) diminuíram drasticamente com uma incubação de apenas 30 min com 2-AAPA 100  $\mu\text{M}$ , indicando uma grande perda na função mitocondrial, e da capacidade de produzir ATP (BRAND; NICHOLLS, 2011).



**Figura 12. Função mitocondrial em células A172 expostas a 2-AAPA.**

As células foram tratadas com 2-AAPA por 30 min e o potencial de membrana mitocondrial foi analisado pelo corante TMRE (A) e a função mitocondrial analisada por respirometria de alta resolução (B-E). (A) potencial de membrana mitocondrial; (B) quantificação do “respiratory control ratio”; (C) quantificação da capacidade de reserva mitocondrial e (D) quantificação da respiração acoplada a produção de ATP. (E) Perfil do consumo de oxigênio em células controle não tratadas (painel superior), e células tratadas com 2-AAPA 100  $\mu$ M por 30 min (painel inferior). Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. Diferenças estatística foram calculadas por ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Dunnet (A), ou teste “t” de Student (B-D) e indicado por \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  em relação ao grupo controle.

Já como a inibição da GR pode levar a oxidação de tióis proteicos e de GSH, também analisamos se o tratamento com 2-AAPA poderia estar levando a esse quadro nas células A172, e assim contribuindo para a toxicidade. Interessantemente, a exposição das células à 2-AAPA por apenas 30 min resultou em um aumento de 1,5 vezes nos níveis de GSH (Fig. 13A) e NPSH (Fig. 13B). Os níveis de tióis proteicos não foram alterados (Fig. 13C). Dessa forma, podemos concluir que o tratamento com 2-AAPA 100  $\mu\text{M}$  não está causando uma oxidação extensa dos tióis celulares, ao contrário da diminuição que geralmente se encontra na literatura (BIZZOZERO et al., 2006). Os dados sugerem que, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , o 2-AAPA induziu à síntese de GSH e que o estresse oxidativo esteja afetando somente proteínas mais sensíveis, como as Prx.



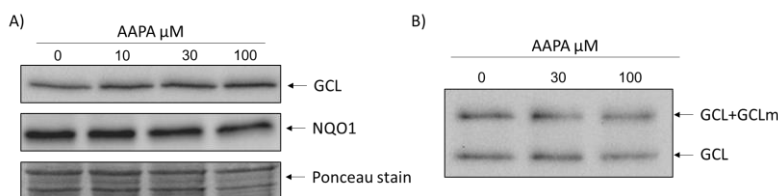
**Figura 13. Modulação dos níveis de GSH-t e de tióis não proteicos em células A172 tratadas com 2-AAPA.**

As células foram incubadas com 2-AAPA 10, 30 ou 100  $\mu\text{M}$  por 30 min e os níveis de glutathiona total (A); tióis não protéicos (NPSH) (B); e tióis proteicos (C) foram analisados. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram calculadas com ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Dunnet e indicadas por \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo controle.

A síntese de GSH é controlada e limitada pela atividade da subunidade catalítica da GCL (GCLc). Como mostra a Figura 14A, os níveis da GCLc não foram alterados pelo tratamento com 2-AAPA 100

$\mu\text{M}$  por 30 min. Uma vez que a expressão de GCLc está sobre o controle do Nrf2 (LU, 2013), analisamos o imunconteúdo de outra proteína que está sob o controle por este fator de transcrição: a NAD(P)H quinona oxidoreductase (NQO1). Assim como a GCLc, os níveis dessa proteína não foram alterados pelo tratamento com 2-AAPA 100  $\mu\text{M}$  por 30 min, indicando que o aumento da GSH observado não é dependente de síntese protéica.

A ativação da GCLc pode ser regulada através da oxidação de uma de suas cisteínas, induzindo a formação de uma ponte dissulfeto intermolecular com a sua subunidade modulatória (GCLm), e poderia explicar o aumento nos níveis de GSH. Através de redox-western blot é possível analisar a proporção da GCLc ligada à GCLm devido ao aumento aparente peso molecular da GCLc. Como apresentado na Figura 14B, após os 30 min com 2-AAPA 100  $\mu\text{M}$  não foi observado nenhum aumento nos níveis de GCL de alto peso molecular (banda superior). Este resultado indica que o aumento nos níveis de GSH não pode ser explicado pela dimerização da GCLc com a subunidade modulatória (GCLm).



**Figura 14. Expressão e estado redox da enzima glutamato-cisteína ligase e expressão da enzima NADPH quinona oxidoreductase.**

Células A172 foram tratadas com 2-AAPA por 30 min e as amostras foram analisadas por Western blot para: (A) níveis da GCL e NQO1; (B) Redox-western blot mostrando a heterodimerização da GCLc com a GCLm. Imagem representativa mostrando a subunidade catalítica (GCLc, banda inferior), ou o complexo GCLc-GCLm (banda superior). Imagens são representativas de pelo menos 3 experimentos independentes. Não foram detectadas diferenças estatísticas pela ANOVA de uma via.

### 3.4. Discussão

A modulação do estado de oxidação dos sistemas tiólicos celulares pode servir como uma valiosa ferramenta ao estudo de diversas situações patológicas. A inibição das tióis redutases (GR e TrxR) são comumente usadas na literatura para estudar o papel desses sistemas na proteção e morte celular (FOLDA et al., 2016; HAN et al., 2006; MARZANO et al., 2007). A inibição da TrxR é induzida de maneira específica e eficiente com algumas drogas como auranofina e aurotiomalato (DU et al., 2012), porém ainda não existe uma boa ferramenta farmacológica para a inibição específica da GR. O BCNU é o inibidor da GR mais utilizado na literatura, mas a sua propriedade de alquilar DNA dificulta a interpretação dos dados. O 2-AAPA foi sintetizado em 2009 como um inibidor da GR (XIE et al., 2014; ZHAO et al., 2009b). Evidências mostram que 2-AAPA é um modulador seletivo dos sistemas tiólicos celulares (GSH), inibindo o sistema de reciclagem e troca tióis-disulfeto dependentes de GR, mas não apresenta efeitos inibitórios sobre enzimas de detoxificação como SOD, GPx e CAT (ZHAO et al., 2009a).

Neste trabalho, mostramos, pela primeira vez que, além de um bom inibidor da GR, o 2-AAPA também é um potente inibidor da TrxR, como demonstrado com a enzima purificada ou em extratos de células A172. A importância dos sistemas da GSH e Trx na proteção de células cancerígenas é destacada por diversos trabalhos (HARRIS et al., 2015; SCARBROUGH et al., 2012; SCHUMACKER, 2015). Células cancerígenas geralmente possuem níveis elevados de ERO, quando comparadas com células normais e, conseqüentemente, apresentam um aumento na expressão de enzimas antioxidantes (AYKIN-BURNS et al., 2009; SCHUMACKER, 2015). Desta forma, o estudo de como esses sistemas interagem para promover a proteção de células cancerígenas é de grande importância. Isso é enfocado por trabalhos recentes que mostram que a inibição conjunta dos sistemas redutores da GSH e da Trx potencializa a morte de células cancerígenas (HARRIS et al., 2015; ROH et al., 2016). Esta inibição também sensibiliza células cancerígenas à agentes oxidantes, à privação de glicose, à irradiação de raios X e à outros agentes tóxicos (SCARBROUGH et al., 2012; SIMONS et al., 2009; ZHAO et al., 2009b).



Uma incubação de 30 min com 2-AAPA promoveu uma grande diminuição na atividade da GR (Fig. 10), muito mais acentuada do que reportado anteriormente (XIE et al., 2014). Interessantemente, a inibição da TrxR nessas células foi quase tão intensa quanto a inibição da GR com um  $IC_{50}$  de 8,7  $\mu$ M, muito próximo do  $IC_{50}$  da GR (6,7  $\mu$ M). Apesar da inibição da TrxR por 2-AAPA já ter sido relatada na literatura, todos os efeitos dessa droga tem sido atribuídos a sua capacidade de inibir a GR, modulando assim o sistema redutor da GSH (DAMGAARD et al., 2016; HABENER et al., 2016). Dessa forma, trabalhos utilizando essa droga como um inibidor da GR devem ter cuidado ao interpretar os dados, já que parte dos efeitos observados podem ser derivados da inibição da TrxR.

Interessantemente, 2-AAPA não exibiu nenhuma toxicidade na concentração de 10  $\mu$ M, mesmo inibindo a GR e a TrxR em torno de 50%. Na concentração de 30  $\mu$ M, na qual a atividade da GR estava quase abolida e a da TrxR diminuída em 40%, observamos cerca de 30% de diminuição da viabilidade (Fig. 10). No entanto, esses dados são consistentes com diversas observações na literatura, na qual indicam que a perturbação do metabolismo da GSH sozinho geralmente não é o suficiente para induzir morte celular. Por exemplo, camundongos deficientes em GR são viáveis (ROGERS et al., 2004), e a maioria dos animais e culturas celulares possuem uma alta tolerância à depleção da GSH ou a inibição de sua síntese (ERIKSSON et al., 2015; SHI et al., 2000). Da mesma forma, a inibição da TrxR sozinha não é tóxica para todas as células, apenas quando essa é acompanhada pelo aumento de ERO e oxidação da Trx (DU et al., 2012). Interessantemente, a única concentração que apresentou uma alta toxicidade nas células A172 foi a de 100  $\mu$ M, quando ambas enzimas estavam inibidas em mais de 80% (Fig. 10). Dessa forma, é esperado que nessas condições a reciclagem tanto de GSSG como de Trx-S<sub>2</sub> estejam drasticamente comprometidas, um efeito já demonstrado pela literatura pelo aumento de glutatilação de proteínas e o acúmulo de GSSG (XIE et al., 2014).

Outra observação interessante em nosso estudo foi que a diminuição da viabilidade celular pela exposição à 2-AAPA 100  $\mu$ M foi precedida por um aumento na oxidação das Prx1, Prx2 e Prx3. As Prx são muito sensíveis a oxidação, sinalizando a perda de homeostasia redox e estresse oxidativo (HAMPTON; CONNOR, 2016; POYNTON; HAMPTON, 2014). Já como o tratamento com 2-AAPA também inibiu a TrxR, a oxidação das Prx pode ser um reflexo da falta de reciclagem da Trx ou um aumento na produção de ERO. Apesar de não termos analisado a produção de ERO, a segunda hipótese é mais provável pelos seguintes

motivos: a concentração de 30  $\mu\text{M}$  2-AAPA não alterou o estado redox das Prx, mesmo inibindo ~60% da TrxR. Além disso, um trabalho demonstrou que a inibição de 90% da TrxR por auranofina não causa oxidação da Prx3 em células desprovidas de DNA mitocondrial, demonstrando a necessidade de um aumento na geração de ERO pela cadeia respiratória para haver a oxidação da Prx (BROWN; COX; HAMPTON, 2010). De qualquer forma, nossos dados apontam que apenas a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de 2-AAPA levou à um acúmulo significativo de ERO nas células, que podem ter contribuído para a perda de viabilidade celular. A oxidação da Prx3 é particularmente interessante, pois vários trabalhos demonstram que a oxidação desta Prx precede a perda da função mitocondrial e leva a apoptose (COX et al., 2008a). Além disso, a sobre-expressão de Prx3 promove proteção contra estresse oxidativo (NONN; BERGGREN; POWIS, 2003), enquanto seu *knockdown* deixa as células mais vulneráveis (CHANG et al., 2004).

A GR e a TrxR possuem uma grande importância na regulação dos níveis de peróxido celulares (DRECHSEL; PATEL, 2010; DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005; MITOZO et al., 2011). Os únicos agentes redutores fisiológicos da GPx e Prx são a GSH e Trx, respectivamente (LU; HOLMGREN, 2014; SCHAFER; BUETTNER, 2001), e dessa forma a inibição destes sistemas de reciclagem pode comprometer a capacidade da célula em degradar peróxidos. Por isso, decidimos verificar se a capacidade de eliminação de peróxidos havia sido comprometida pelo tratamento com 2-AAPA. Tendo em vista que mesmo a concentração mais baixa de 2-AAPA provocou uma diminuição de mais de 50% na capacidade de reciclagem de GSSG, podemos concluir que a capacidade de regeneração da GPx foi fortemente prejudicada. Da mesma forma, também é esperado que a ação das Prx seja comprometida pela inibição da TrxR. Assim, fica claro que a maior parte da metabolização do  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado as células de uma só vez é feita por vias independentes das tióis-peroxidases, como por exemplo a CAT. Corroborando com a falta de efeito sobre a velocidade de degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o tratamento com 2-AAPA não apresentou sinergismo com  $\text{H}_2\text{O}_2$  quando analisamos a viabilidade celular, indicando que a eliminação desse peróxido foi eficiente em proteger as células contra o dano oxidativo. No entanto, também temos evidências de que a GR pode ter grande participação na proteção contra  $\text{H}_2\text{O}_2$  em alguns tipos celulares. Em um trabalho publicado recentemente, verificamos as diferenças nas defesas antioxidantes de células SH-SY5Y no seu estado proliferativo e diferenciado em neurônio dopaminérgico (LOPES et al., 2017). Em

contraste com as nossas observações nas células A172, a inibição da GR por 2-AAPA apresentou um efeito sinérgico com  $H_2O_2$  em células dopaminérgicas SH-SY5Y (dados submetidos para publicação, anexo II). Diferenças na expressão das enzimas responsáveis pela degradação de peróxidos poderia explicar esse fenômeno, como os baixos níveis de CAT nestas células. Por exemplo, uma baixa atividade da CAT nas células SH-SY5Y poderia sobrecarregar as demais peroxidases, o que ainda precisa ser confirmado.

O tratamento com 2-AAPA diminuiu fortemente a degradação de CHP pelas células (Fig. 10). Ao contrário do  $H_2O_2$ , a CAT não degrada peróxidos orgânicos, e dessa forma a degradação desses peróxidos é dependente exclusivamente dos sistemas da GSH e Trx. Como o tratamento com 2-AAPA inibiu os dois sistemas, não podemos concluir qual enzima é a principal responsável pela eliminação do CHP nessas células. Por outro lado, diversos trabalhos indicam uma participação maior da GPx nesse processo. Por exemplo, culturas de astrócitos deficientes em GPx1 tem uma perda de 70% na velocidade de eliminação de CHP, quando comparadas com células controle (LIDDELL et al., 2006). Além disso, a depleção de GSH por BSO nessas células praticamente inibe a degradação desse peróxido, sugerindo uma participação quase exclusiva da GSH na eliminação de CHP. A inibição da GR por BCNU também retarda significativamente a degradação de CHP em células neurais, um efeito que não foi observado pela inibição da TrxR (MITOZO et al., 2011). Além de diminuição da degradação de CHP, o tratamento com 2-AAPA também apresentou sinergismo com esse peróxido, deixando as células mais vulneráveis a toxicidade a este peróxido. Assim, fica clara a importância desses sistemas para a proteção dessas células contra peróxidos orgânicos.

Já como a diminuição de viabilidade celular foi precedida pela oxidação da Prx3 mitocondrial (Fig. 11), também analisamos a parâmetros relacionados com a função da mitocôndria para observar possíveis disfunções nessa organela. Interessantemente, observamos um aumento no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) pelo tratamento com 2-AAPA 100  $\mu M$  (Fig. 12A). A participação da Trx na manutenção do  $\Delta\Psi_m$  e função mitocondrial já é conhecida. A sobre-expressão de Trx2 promove um aumento na  $\Delta\Psi_m$  e confere proteção contra agentes oxidantes na mitocôndria (DAMDIMOPOULOS et al., 2002). Por outro lado, a deleção da Trx2 aumenta a sensibilidade de células dopaminérgicas a estresse oxidativo e causa disfunção mitocondrial (LOPERT; DAY; PATEL, 2012). Existe uma correlação positiva entre o

$\Delta\Psi_m$  e a produção de ERO pela mitocôndria (KORSHUNOV; SKULACHEV; STARKOV, 1997). Dessa forma, é possível que o tratamento com 2-AAPA esteja aumentando a produção de ERO pela mitocôndria, o que também explicaria a oxidação da Prx3. No entanto, mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese. Em contraste com nossos resultados, Xie e colaboradores encontraram uma diminuição do  $\Delta\Psi_m$  pela exposição de cardiomiócitos de ratos H9c2 ao 2-AAPA (XIE et al., 2014), o que pode ser um efeito célula-específico, mas no momento não temos dados suficientes para explicar essa diferença.

Os parâmetros de respiração celular foram fortemente afetados pelo tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de 2-AAPA. Após 30 min de exposição, a respiração acoplada à produção de ATP diminuiu significativamente, o que pode indicar um mal funcionamento da ATP sintase (BRAND; NICHOLLS, 2011; HILL et al., 2012). A inibição da ATP sintase pode provocar um aumento no  $\Delta\Psi_m$  e estresse oxidativo (MAILLOUX; WILLMORE, 2014). Como observamos tanto uma diminuição no nível de desacoplamento da respiração como um aumento no  $\Delta\Psi_m$ , é possível que a ATP sintase possa ser um alvo importante do tratamento por 2-AAPA. Corroborando com essa ideia, a inibição da ATP sintase por glutathionilação já foi demonstrada (MAILLOUX; TREBERG, 2016). Devido às evidências de que o 2-AAPA pode induzir glutathionilação, este é um possível mecanismo a ser estudado, o que poderia explicar a disfunção mitocondrial induzida por 2-AAPA em células A172. A capacidade de reserva mitocondrial também diminuiu significativamente pelo tratamento com 2-AAPA, sugerindo que as mitocôndrias já estavam trabalhando em capacidade máxima. Além disso, a capacidade de reserva é um indicativo do número de mitocôndrias saudáveis (BRAND; NICHOLLS, 2011). Dessa forma, é possível hipotetizar que a diminuição de viabilidade celular induzida por 2-AAPA parece ser dependente de disfunção mitocondrial.

A redução da GSSG depende da eficiente atividade GR, e dessa forma, alterações na homeostase da GSH são esperadas quando esta enzima não está funcional. Não observamos nenhuma alteração no conteúdo de GSH pelo tratamento das células A172 com 2-AAPA 10 ou 30  $\mu\text{M}$ , mas quando as células foram expostas a 100  $\mu\text{M}$  2-AAPA, observamos um aumento de 1.5 vezes nos níveis de GSH (Fig. 14). Em contraste com nossos resultados, Zhao e colaboradores reportam uma diminuição de 25% na GSH celular após a exposição de células renais de macaco à 2-AAPA (ZHAO et al., 2009a). Outros trabalhos, porém

mostraram um aumento do conteúdo de GSH em cardiomiócitos tratados por curto prazo (2 h) com 2-AAPA (XIE et al., 2014), concordando com nossos resultados. A taxa da síntese de GSH é controlada pela atividade GCL, que por sua vez é modulada em diversos níveis. Com o objetivo de compreender os mecanismos que levaram ao aumento da GSH em nosso modelo, observamos os efeitos do 2-AAPA sobre a GCL por duas formas: pelos níveis presentes da enzima e pela sua interação com a subunidade modulatória. Porém, nenhum desses fatores parece ter sido alterado pela exposição ao 2-AAPA (Fig. 15). Apesar de observarmos um rápido aumento nos níveis de GSH, não podemos explicar quais mecanismos envolvidos nesta resposta. A atividade da GCL também pode ser modulado por diversos outros fatores, como miristoilação, fosforilação, concentração de NADPH, entre outros (FRANKLIN et al., 2009), os quais são interessantes alvos para futuros estudos.

Resumindo, demonstramos que o tratamento de células A172 com 2-AAPA interfere com os sistemas de reciclagem da GPx e Prx pela inibição da GR e da TrxR. Também demonstramos que 2-AAPA é capaz de inibir a TrxR na mesma faixa de concentração que inibe a GR, e mostramos pela primeira vez que as Prx1, Prx2 e Prx3 são oxidadas pelo tratamento com 2-AAPA. Além disso, a função mitocondrial das células A172 foram severamente comprometidas pelo tratamento com 2-AAPA, o que pode ser um fator relevante para a sua toxicidade. Tendo em vista que a inibição das duas tiol-redutases (GR e TrxR) tem se mostrado mais eficiente que a inibição de apenas um dos sistemas para matar células cancerígenas, essa droga pode ser uma ferramenta interessante para pesquisas focadas na modulação dos sistemas tiólicos para possíveis terapias.

## 4. Estado redox das peroxiredoxinas em cultivos de neutrófilos humanos e células HL60

### 4.1. Introdução

Neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes e são efetores essenciais da defesa imune inata. Os neutrófilos são produzidos continuamente na medula óssea e liberados na circulação, onde agem como a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos. Normalmente, essas células migram para focos de contaminação, onde fagocitam bactérias e fungos, envolvendo-os em vesículas especializadas denominadas fagossomos. Dentro dos fagossomos, os microrganismos são *bombardeados* com peptídeos antimicrobianos, proteases e ERO que agem em sinergismo para promover sua destruição (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1996; NAUSEEF, 2007).

A geração de ERO como meio para eliminar patógenos, denominada *burst oxidativo*, é uma característica principal da atividade antimicrobiana de neutrófilos (CHAPMAN et al., 2002; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1996; WINTERBOURN; KETTLE, 2013). A produção de ERO nessas situações se deve, principalmente, ao complexo enzimático NOX. Este complexo proteico é constituído de duas proteínas integrais e diversas subunidades regulatórias, as quais se encontram dissociadas em situações basais. No entanto, quando o neutrófilo é estimulado, as subunidades regulatórias são recrutadas para a membrana dos fagossomos. Após a formação do complexo, a NOX catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando  $O_2^{\bullet-}$ , que é lançado para lúmen do fagossomo (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007). É estimado que, durante a ativação máxima do neutrófilo, o conteúdo total de NADPH é oxidado à  $NADP^+$  em menos de um segundo e, dessa forma, a regeneração eficiente do NADPH é necessária para a manutenção do *burst oxidativo*. A principal rota de redução do  $NADP^+$  à NADPH depende da via das pentoses fosfato (DECOURSEY; LIGETI, 2005; WINTERBOURN; KETTLE, 2013). O tempo de duração do *burst oxidativo* parece ser dependente do estímulo, podendo durar de um a noventa minutos (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

No interior do fagossoma, o  $O_2^{\cdot-}$  produzido reage com diversos alvos, gerando uma gama de ERO secundárias. Entre os alvos do  $O_2^{\cdot-}$  está a mieloperoxidase (MPO), uma enzima que é liberada no fagossomos através da fusão de grânulos citoplasmáticos do neutrófilo (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1996; WINTERBOURN; KETTLE, 2013). A MPO é a única enzima conhecida que reage com  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  com velocidades significativas dentro do fagossoma e, por isso, controla as reações redox nesse ambiente (KETTLE et al., 2007). Assim que o  $O_2^{\cdot-}$  é lançado no fagossoma, ele reage rapidamente com a MPO gerando  $H_2O_2$ , que logo em seguida participa de uma segunda reação com a MPO produzindo HOCl, um potente agente bactericida. De fato, cerca de 30% do  $O_2^{\cdot-}$  produzido pode ser detectado na forma de HOCl; evidências experimentais sugerem que essa espécie é um dos principais agentes responsáveis pela eliminação de diversas espécies de bactérias (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

Por muito tempo, os neutrófilos foram vistos como células simples, com o único objetivo de eliminar patógenos. De fato, os neutrófilos possuem uma vida curta, geralmente morrendo por apoptose em menos de 24 h após serem liberados para a circulação (LUO; LOISON, 2008). No entanto, evidências recentes indicam que essas células também possuem um papel central no controle e término de processos inflamatórios, além de produzirem diversas citocinas (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014). Neutrófilos geralmente morrem por apoptose após a fagocitose, mas, em algumas situações, incluindo falhas da correta sinalização, podem contribuir para inflamação crônica, o que pode contribuir para o desenvolvimento de câncer, sepse e aterosclerose (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os mecanismos que controlam esses processos em neutrófilos, no entanto, ainda são pouco compreendidos. Como os neutrófilos produzem grande quantidade de ERO durante o *burst oxidativo*, é provável que muitos destes processos sejam moduladas por mecanismos redox e, de fato, diversas evidências apontam para esta possibilidade. Por exemplo, ERO são capazes de *preparar* o neutrófilo, facilitando uma subsequente ativação do *burst oxidativo* (SWAIN; ROHN; QUINN, 2002). Além disso, o controle da morte celular após a fagocitose também parece ser modulado por ERO. A ativação da NOX, por exemplo, é necessária para a exposição extracelular do fosfolídio de membrana fosfatidilserina. A externalização da fosfatidilserina facilita a captura dos restos celulares pelos macrófagos, e a adição de CAT bloqueia a apoptose, indicando a participação do  $H_2O_2$

nessas situações (HAMPTON et al., 2002; WATSON, 2002; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016).

Enquanto o *burst oxidativo* é uma importante ferramenta na eliminação de microrganismos, as ERO também podem gerar estresse oxidativo aos próprios neutrófilos. Apesar da maior parte da produção de ERO seja feita pela NOX e direcionada para dentro dos fagossomos, ERO permeáveis, como  $H_2O_2$  ou HOCl, podem se difundir pela membrana e atacar proteínas e outras biomoléculas no citosol dos neutrófilos. Por exemplo, após a fagocitose, as proteínas dos neutrófilos apresentam uma maior proporção de 3-clorotirosina (produto da reação de HOCl e resíduos de tirosina) do que as proteínas das bactérias fagocitadas (CHAPMAN et al., 2002). A depleção de GSH pela ativação do *burst oxidativo* também já foi observada (OGINO; PACKER; MAGUIRE, 1997), indicando grandes alterações no ambiente redox de neutrófilos após a estimulação. Além disso, a NOX está presente em outros compartimentos celulares onde a produção de ERO não deve estar envolvida com a atividade antimicrobiana, sugerindo que essa produção de ERO pode ter um papel modulatório (BYLUND et al., 2010). No entanto, ainda não existem muitos trabalhos explorando a regulação redox em neutrófilos, o que limita enormemente o entendimento sobre esses processos.

Como um dos principais sensores redox na célula, as Prx têm recebido grande atenção da comunidade científica em relação à estudos de processos inflamatórios. A Prx1 e Prx2, por exemplo, são secretadas por diversas células inflamatórias em resposta a diferentes estímulos, incluindo lipopolisacarídeos ou  $TNF-\alpha$  (MULLEN et al., 2015). Essas Prx são secretadas na sua forma oxidada como dímeros e a mutação das cisteínas peroxidáticas ou de resolução bloqueia esta secreção, indicando que esse fenômeno é dependente de oxidação. Acredita-se que as Prx funcionem como um sinal de perigo no meio extracelular, estimulando a produção de citocinas por células inflamatórias (SALZANO et al., 2014). De fato, a ligação de Prx extracelular com o receptor TLR4 (do inglês *toll-like receptor 4*) estimula a secreção de citocinas em macrófagos e em células dendríticas por uma via dependente de  $NF\kappa-B$  (RIDDELL et al., 2010). A Prx6 também é um importante fator na ativação da NOX em neutrófilos. Após estimulação, esta proteína é translocada para a membrana, aonde interage com subunidades da NOX e aumenta a atividade desta oxidase (AMBRUSO et al., 2012; KWON et al., 2016).

Até o momento, no entanto, a participação das Prx na regulação de processos redox em neutrófilos não foi explorada. Dessa forma,



tivemos como objetivo caracterizar possíveis alterações no estado redox de Prx durante o *burst oxidativo*. Como modelo para os experimentos, utilizamos células pró-mielocíticas humanas HL60 diferenciadas em neutrófilos. Através de manipulação farmacológica ou exposição a bactérias, as células foram estimuladas a produzir o *burst oxidativo*. Acompanhamos a oxidação da Prx1 durante essas condições e estudamos o envolvimento da NOX através do uso de um inibidor. Também comparamos esses resultados com dados obtidos em neutrófilos durante minha estadia no laboratório “Center for Free Radical Research”, na Nova Zelândia, onde o presente trabalho também foi realizado.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Cultura e diferenciação de células HL60

As células pró-mielocíticas HL60 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina, soro fetal bovino 10 % e mantidas à 37°C em ambiente úmido com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas em baixa densidade (entre 0,2 x 10<sup>6</sup> e 1 x 10<sup>6</sup> células/ml e utilizadas até o máximo de 15 passagens. Para a diferenciação, 1,25 % DMSO ou 1 µM de ácido retinóico (ATRA) foi adicionado a 0,25 x 10<sup>6</sup> células/ml e incubadas por 6 dias (COLLINS et al., 1978), sendo que o meio foi trocado no terceiro dia para a reposição de nutrientes. Após a diferenciação, as células diferenciadas (dHL60) foram coletadas por centrifugação (5 min à 1.000 g) e resuspensas em meio RPMI. Células (2 x 10<sup>6</sup>) foram tratadas com PMA (100 ng/ml) ou incubadas na presença de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (1:20 células) pelos tempos indicados. Em alguns experimentos, as células foram incubadas por 15 min com cloreto de difeniledônio (DPI, 10 µM) antes da exposição ao SA. No grupo controle, as células igualmente tratadas, mas na ausência de *S. aureus*.

### 3.2.2 Preparação de *Staphylococcus aureus*

Uma colônia de *S. aureus* (SA) foi cultivada em uma placa com ágar sague a 37°C *overnight* e mantida a 4°C por no máximo 2 semanas.

Uma única colônia foi retirada da placa e cultivada *overnight* em 10 ml de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) 10%, lavado 2 vezes com PBS e centrifugada a 1.200 g por 5 min para precipitar células mortas. A contagem de células foi determinada por densidade ótica e as células foram mantidas em gelo até o início do experimento.

### 3.2.3 Detecção da produção de superóxido pela redução do citocromo C

Células HL60 ( $0,5 \times 10^6$  células/ml) foram adicionadas ao tampão HBSS contendo 20 µg/ml de catalase e 40 µM de citocromo C, incubadas à 37°C. PMA (100 ng/ml) foi adicionado para iniciar o *burst respiratório* e a absorbância em 550 nm foi medida por 10 min. A parte linear da curva de absorbância foi usada para calcular a taxa de produção de superóxido.

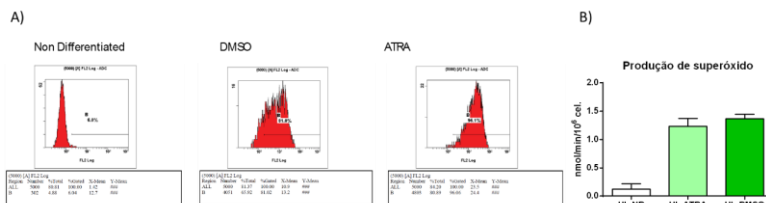
### 3.2.4 Detecção das Prx por Immunoblot

A detecção do estado de oxidação das Prx e Western blot foram realizadas como descrito no item 2.2.3. As membranas foram incubadas com os anticorpos contra Prx1 (Abcam, 1:10000), Prx2 (Sigma, 1:10000) ou Prx-SO<sub>3</sub> (Labfrontier, 1:3000). As imagens foram reveladas usando-se técnicas de quimioluminescência padrão no fotodocumentador UVITEC alliance (Cambridge, UK). As bandas foram quantificadas com o software UVIBAND (Cambridge, UK).

## 4.3 Resultados

As células HL60 são uma linhagem pró-mielocítica que podem ser diferenciadas a um fenótipo tipo-neutrófilico pelo tratamento com ATRA ou DMSO. As células foram incubadas com 1,25% DMSO ou 1 µM ATRA por 6 dias, e a eficiência da diferenciação foi confirmada por 3 critérios: a) as células eram visualmente menores se comparadas com a células não-diferenciadas (ARROYO et al., 2002); b) a expressão do marcador de neutrófilos CD11b foi aumentada por ambos os tratamentos

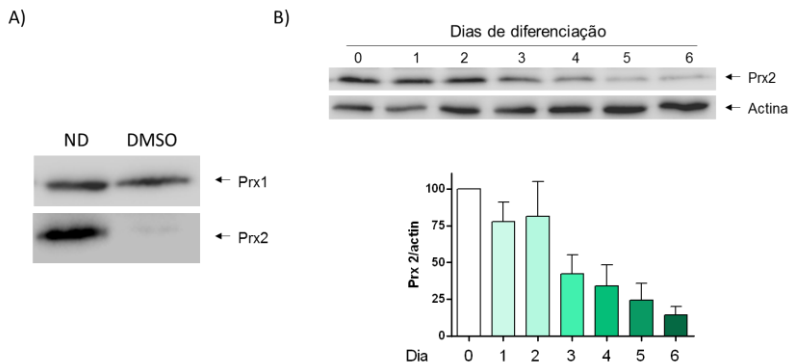
(Fig. 15A); e c) a produção de  $O_2^{\cdot-}$  aumentou drasticamente em resposta ao tratamento com PMA. Como mostrado na Figura 15B, a produção de  $O_2^{\cdot-}$  passou de 0,3 nmol/min/ $10^6$  células não diferenciadas, para 1,3 nmol/min/ $10^6$  células diferenciadas, de acordo com o que foi previamente descrito (ARROYO et al., 2002).



**Figura 15. Marcadores de diferenciação de células HL60.**

Células promielocíticas HL60 foram diferenciadas com 1,25% DMSO ou 1  $\mu$ M ATRA por 6 dias e marcadores de diferenciação foram analisados. (A) Histogramas obtidos através de citometria de fluxo demonstrando a presença do marcador de neutrófilos CD11b em células não diferenciadas ou diferenciadas; (B) Produção de superóxido em resposta à PMA foi analisado em células não diferenciadas ou diferenciadas.

Para verificar se a diferenciação poderia alterar a expressão de Prx, em seguida analisamos os níveis de Prx1 e Prx2. As células diferenciadas com ATRA não apresentaram qualquer alteração nos níveis dessas enzimas, porém, as células diferenciadas com DMSO apresentaram uma diminuição dos níveis da Prx2, mas não da Prx1 (Fig. 17 A). Como apresentado na Figura 16 B, a expressão de Prx2 diminuiu progressivamente com o tempo, atingindo 50% no terceiro dia de diferenciação, e restando apenas 15% após o sexto dia de diferenciação. O gráfico da Figura 16 B representa a quantificação das bandas.

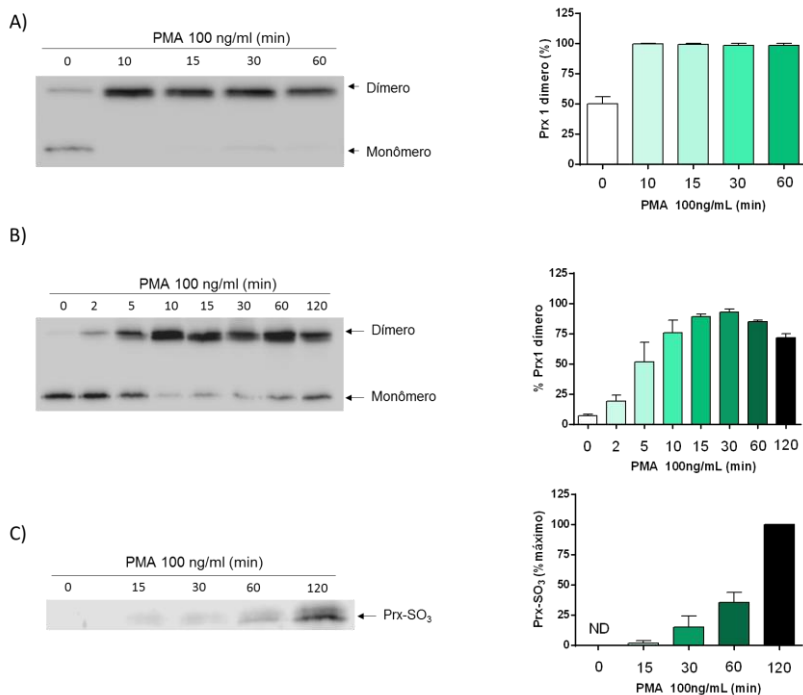


**Figura 16. Modulação da expressão de Prx1 ePrx2 pela diferenciação de células HL60 por DMSO.**

Células HL60 foram expostas à DMSO 1,25 % por até 6 dias, e o imunoc conteúdo de Prx1 e Prx2 foi analisado por Western blot. (A) imunoc conteúdo de Prx1 e Prx2 6 dias após as células serem diferenciadas com DMSO 1,25 %. (B) Perfil temporal do imunoc conteúdo de Prx2 de células HL60 expostas à DMSO 1,25 % e gráfico de sua quantificação. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes. ND = não diferenciadas; DMSO = diferenciação induzida pela adição de DMSO 1,25%.

Células HL60 diferenciadas (dHL60) são capazes de gerar o *burst oxidativo*, gerando  $O_2^{\bullet-}$  e outros radicais quando estimuladas, devido a sua capacidade de ativar o complexo NOX (HAUERT et al., 2002). PMA é um potente ativador do complexo NOX, por esta razão utilizamos essa ferramenta para estudar a modulação do estado redox da Prx1 após a indução do *burst oxidativo*. Após a diferenciação com DMSO ou ATRA, as células dHL60 foram incubadas com PMA 100 ng/ml por diferentes tempos e a oxidação da Prx1 foi analisada como descrito nos materiais e métodos. Quando as células foram diferenciadas com ATRA, observamos aproximadamente 45% da Prx1 na forma oxidada, mesmo sem a estimulação com PMA (Fig. 17 A). Entretanto, a Prx1 estava predominantemente na forma reduzida (80-90%) nas células diferenciadas com DMSO (Fig. 17 B), contrastando com o alto nível de oxidação basal nas células diferenciadas com ATRA. Após estas células serem incubas por 10 min com PMA, a Prx1 ficou totalmente oxidada. A

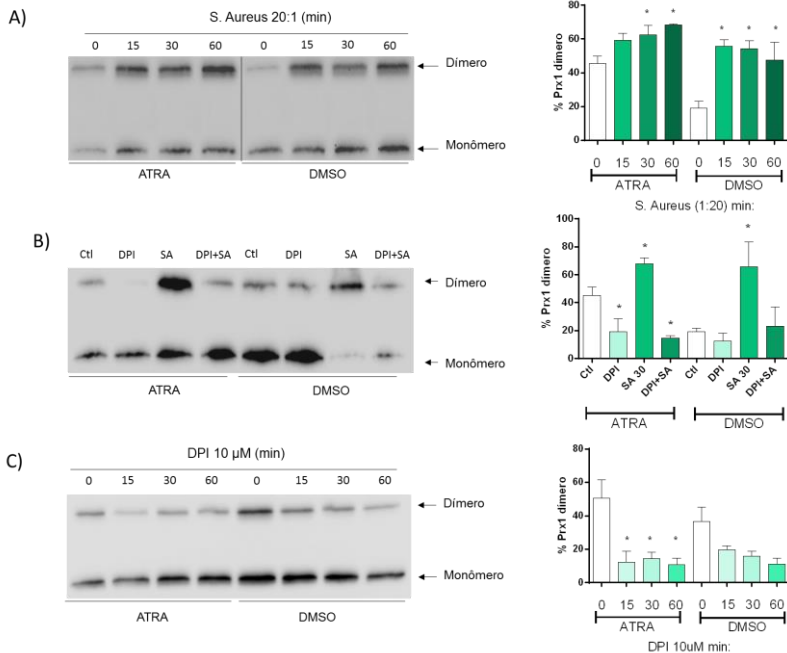
oxidação da Prx1 em células dHL60 tratadas com DMSO apresentou um perfil tempo-dependente, como mostra a Figura 17B. Aproximadamente 50% da Prx1 se apresentava dimerizada 5 min após o início do tratamento, passando a estar quase completamente dimerizada 10 min de incubação. Aos 60 min de tratamento foi possível ver um claro reaparecimento da forma monomérica, o que pode indicar dois fenômenos: a) a  $C_p$  da Prx1 pode estar passando ao estado superoxidado, o que faz com que ela corra como monômero no Western blot; ou b) o sistema de reciclagem Trx/TrxR está reduzindo a Prx1 de maneira mais eficientemente do que no início do tratamento. Para verificar qual dessas hipóteses explicam a nossa observação, utilizamos um anticorpo contra a forma superoxidada da Prx (Prx-SO<sub>2</sub> e Prx-SO<sub>3</sub>). Como apresentado na Figura 17C, observamos um nítido aumento na forma superoxidada da Prx após 30 min, indicando que a hipótese (a) é a mais provável.



**Figura 17. Estimulação de células dHL60 com PMA leva a oxidação da Prx1.**

*Burst respiratório* foi induzido em dHL60 pela exposição à PMA (100 ng/ml) e o estado redox da Prx1 foi analisado como descrito nos materiais e métodos. Curva tempo-resposta do estado de oxidação da Prx1 em dHL60 diferenciadas com ATRA (A), ou DMSO (B). (C) Curva tempo-resposta da superoxidação da Prx em células dHL60 diferenciadas com DMSO. Gráficos à direita apresentam as respectivas quantificações, e os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. Quantificações estão expressas como porcentagem de dímero em relação a proteína total (dímero mais monômero). A Prx-SO<sub>3</sub> está representada pela porcentagem do sinal em relação ao grupo PMA 120 min.

O *burst oxidativo* em células dHL60 pode ser induzido com agentes farmacológicos como o PMA, mas também pode ser induzido pela presença de bactérias, iniciando o processo de fagocitose. Assim, essas células são consideradas um bom modelo de neutrófilo para o estudo da ativação do *burst oxidativo* e da eliminação de patógenos (NORDENFELT et al., 2009). Dessa forma, verificamos se a estimulação de dHL60, pela presença de *S. aureus*, seria capaz de induzir a oxidação da Prx1, como observamos pela estimulação por PMA. Para tanto, as células foram expostas por até 60 min a *S. aureus* (SA) na razão de 1:20, e o estado redox da Prx1 foi analisado. Tanto nas células dHL60 diferenciadas com DMSO, quanto com ATRA, a exposição à *S. aureus* aumentou significativamente a oxidação da Prx1, apresentando cerca de 60% de oxidação após 15 min. Já como o *burst oxidativo* é dependente da ativação da NOX, verificamos se a oxidação observada da Prx1 se deve realmente a ativação desta enzima. Para tanto, pré-tratamos as células dHL60 com 10  $\mu$ M de DPI por 15 min para inibir a NOX. Este pré-tratamento foi seguido da exposição à SA. Como esperado, a pré-incubação com DPI, levando a inibição da NOX, aboliu a resposta de oxidação da Prx1 pela fagocitose. Este resultado indica que as ERO derivadas da NOX são responsáveis pela oxidação da Prx1 durante a estimulação com bactérias (Fig. 18B). Interessantemente, a incubação com DPI sozinho diminuiu a oxidação da Prx1 em situação basal em ambas as células dHL60 (Fig. 18C). Esse dado também sugere que a NOX, pela produção de  $H_2O_2$ , contribuí significativamente com a dimerização da Prx1. Também indica que, nessas células há uma constante reciclagem da Prx1 oxidada.



**Figura 18. Efeito da inibição da NADPH oxidase na modulação do estado redox da Prx1 em dHL60 expostas à *S. aureus*.**

(A) Células dHL60 foram expostas à *S. aureus* por 15, 30 ou 60 minutos e o estado redox da Prx1 foi analisado. Da mesma forma, o estado redox da Prx1 foi analisado (B) após pré-incubação com DPI 10  $\mu$ M por 15 min antes de serem expostas à *S. aureus* por 30 min ou (C) após incubação com DPI 10  $\mu$ M por 15, 30 ou 60 min. Gráficos à direita apresentam as respectivas quantificações. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de 3-5 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram calculadas com ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Tukey e são indicados com \*  $p < 0,05$ , relativo ao grupo controle.



### 3.4. Discussão

Utilizando as células pró-mielocíticas HL60 diferenciadas como um modelo de células NOX-competentes, tivemos como objetivo estudar o efeito do *burst oxidativo* na modulação redox das Prx. Por serem células de vida curta e facilmente estimuláveis, a manipulação de neutrófilos em laboratório é difícil, enquanto o uso de células HL60 apresentam diversas vantagens, como diminuição da heterogeneidade entre experimentos e o cultivo fácil de um grande número de células. Por isso, diversos trabalhos já utilizaram a diferenciação dessas células para estudar funções de neutrófilos como quimiotaxia, fagocitose e atividade antimicrobiana (BREITMAN; SELONICK; COLLINS, 1980; HAUERT et al., 2002). No entanto, existem algumas limitações; em neutrófilos, a subunidade da NOX flavocitocromo b<sub>558</sub> está em sua maior parte nos chamados grânulos específicos, que estão ausentes nas células HL60 (NORDENFELT et al., 2009). Dessa forma, é esperado que a maior parte das ERO produzidas pelo *burst oxidativo* não seja direcionada para dentro dos fagossomos, como acontece com os neutrófilos.

Como esperado, confirmamos a diferenciação em um estado tipo-neutrófilo após seis dias de tratamento com ATRA ou DMSO. As células HL60 passaram a expressar o marcador de neutrófilos CD11b e adquiriram a capacidade de produzir O<sub>2</sub><sup>-</sup> em resposta à PMA (*burst oxidativo*). Quando analisamos a presença das Prx nessas células, notamos que a diferenciação com DMSO, mas não com ATRA, levou a uma diminuição da expressão da Prx2. Interessantemente, a diferenciação com DMSO também leva à diminuição da expressão da enzima heme-oxigenase (NOH et al., 2011), indicando que a expressão dessas duas enzimas pode estar sendo modulada pela mesma via. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que a exposição a um inibidor da heme-oxigenase (protoporfirina de zinco) também leva ao aumento da expressão de CD11b e, inversamente, um ativador da heme-oxigenase (protoporfirina de cobalto) leva a sua diminuição. Dessa forma, é possível que a expressão de Prx2/heme oxigenase pode estar envolvida na diferenciação e proliferação de células HL60 (NOH et al., 2011), mas mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese.

As Prx são muito importantes na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando este se encontra em baixas concentrações. Assim, com a perda da Prx2 pela diferenciação com DMSO, espera-se que a Prx1 seja a principal via de eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em condições fisiológicas (PERKINS et al., 2015), assim como um maior acúmulo de ERO em situações basais. No entanto,

interessantemente, observamos que o nível basal de oxidação da Prx1 em células diferenciadas com ATRA era de cerca de 40%, enquanto nas células diferenciadas com DMSO esse valor diminui para 20%. Esta redução na oxidação basal da Prx1 pode ter sido mediada por uma maior expressão em outras enzimas antioxidantes. Não verificamos nenhuma diferença nos níveis de Prx1 entre as células não diferenciadas e as diferenciadas com DMSO, porém, outras enzimas, como a GPx, podem ter sido moduladas, compensando a perda da Prx2. Outra possibilidade é que a produção basal de ERO seja maior nas células diferenciadas com ATRA, porém, não conseguimos investigar essa hipótese pois os métodos disponíveis não foram sensíveis o suficiente (dados não apresentados). De qualquer forma, este dado corrobora com a ideia de que o ambiente redox celular é finamente regulado em diversos níveis.

Quando as células dHL60 foram estimuladas com PMA, levando à ativação do *burst oxidativo*, a Prx1 foi quase completamente oxidada nos primeiros 10 min. Além disso, também verificamos que uma fração da enzima fica superoxidada após 60 min, o que comumente leva a sua inativação. A exposição das células dHL60 a *S. aureus* também aumentou significativamente a dimerização da Prx1. Além disso, a inibição da NOX por DPI bloqueou a oxidação da Prx1 mediada pela fagocitose, indicando que a atividade NOX é responsável pelo *burst oxidativo* e condição necessária para o aparecimento dos efeitos observados. Um grande número de oxidantes são produzidos pelo fagossomo do neutrófilo, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cloraminas e HOCl, e grande parte desses é capaz de induzir a oxidação das Prx (BAYER et al., 2013; STACEY et al., 2009). Já como a atividade catalítica da Prx é perdida durante a sua oxidação, a reciclagem dessa enzima pela Trx/TrxR é necessária para a sua reativação. Dessa forma, nossos dados corroboram com a hipótese de que a indução do *burst oxidativo* pode modular o ambiente redox dessas células, passando para um estado mais oxidativo. A oxidação das Prx, por sua vez, pode promover a ativação de diversas vias de sinalização como por exemplo a indução de vias apoptóticas (JARVIS; HUGHES; LEDGERWOOD, 2012), ativação da via JAK/STAT3 (SOBOTTA et al., 2014), entre outros. Dessa forma, futuros estudos observando a modulação redox de vias de sinalização em células dHL60 é um tópico relevante para novos estudos.

Interessantemente, a inibição da NOX por DPI foi capaz de diminuir o nível basal de oxidação da Prx1, sugerindo que, em condições de repouso, essa enzima pode ser importante na modulação dos níveis basais de peróxidos. É importante ressaltar, porém, que o DPI também é

capaz de inibir outras flavoproteínas que também podem contribuir para a produção basal de oxidantes (RATZ et al., 2000). Assim, novos estudos precisam ser conduzidos para confirmar quais enzimas são mais importantes para a produção de  $H_2O_2$  e oxidação da Prx1, conforme observado nessas condições. Da mesma forma, em células diferenciadas com ATRA, uma atividade da NOX nessas enzimas pode ser responsável pelo maior nível de oxidação basal da Prx1.

Em conjunto com os experimentos realizados com células dHL60, também realizamos alguns experimentos com neutrófilos humanos. Assim como os dados anteriores, esses experimentos foram realizados no *Center for Free Radical Research* na Nova Zelândia sob orientação da Dra. Christine Winterbourn, mas não puderam ser inseridos nesta tese. Em contraste com as células dHL60, quando analisamos a oxidação das Prx de neutrófilos em condições basais, verificamos que estas se encontraram quase que completamente oxidadas. A maioria das células apresentam um eficiente sistema de reciclagem Trx/TrxR/NADPH (LU; HOLMGREN, 2014), e sendo assim, é esperado um baixo nível de oxidação das Prx em condições fisiológicas (KANG et al., 2005; LOW et al., 2007). De fato, até onde sabemos, nunca foi relatado que a Prx pode ser encontrada completamente oxidada em uma célula em condições fisiológicas. Primeiramente, pensamos que o protocolo de isolamento dos neutrófilos pudesse estar estimulando as células, ativando a NOX e gerando a produção de  $H_2O_2$ , que mesmo em baixas concentrações poderia gerar uma oxidação artificial das Prx. Assim, uma metodologia mais “branda” foi utilizada para o isolamento dos neutrófilos, com o uso de *beads* magnéticos. Entretanto, obtivemos os mesmos resultados, isto é, a Prx1, Prx2 e Prx3 estavam quase que na totalidade na forma de dímeros. Além disso, apesar do procedimento compreender diversas etapas que pode estressar as células, ele parece não afetar de maneira geral a função celular e capacidade antimicrobiana do neutrófilo, sugerindo que as células não estão ativadas após esse procedimento (CHAPMAN et al., 2002; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1996). Outra hipótese que exploramos para explicar a oxidação das Prx seria a ausência do sistema Trx/TrxR em neutrófilos, o que impossibilitaria a redução das Prx. No entanto, conseguimos detectar níveis equivalentes dessas enzimas aos encontrados em lisado de células Jukart, que consegue reduzir a Prx de maneira eficiente. Além disso, conseguimos detectar atividade apreciável da TrxR em neutrófilos. Dessa forma, é improvável que o sistema Trx/TrxR não seja funcional em neutrófilos.

A estimulação de neutrófilos com PMA ou *S. aureus* também não foi capaz de alterar o estado redox das Prx em neutrófilos. Tendo em vista a grande produção de oxidantes por essas células durante o *burst oxidativo*, era esperado que pelo menos uma fração da Prx2 presente nos neutrófilos pudesse ser encontrada na superoxidada ( $-\text{SO}_2$  ou  $-\text{SO}_3$ ) após estimulação. Entretanto, isto não foi observado, indicando que se ocorre a redução das Prx nessas células, ela não é suficiente para expor a  $\text{C}_p$  aos oxidantes, como observado nas células dHL60. Dessa forma, nossos dados indicam que a Prx1 e Prx2 não estão ativas nessas células. A razão para isso, porém, ainda não está clara, já que as células claramente expressam Trx e TrxR, e consequentemente deveriam ser capazes manter a Prx na sua forma reduzida. Ao contrário do observado nas as células dHL60, o tratamento com DPI também não conseguiu reduzir a oxidação basal das Prx em neutrófilos, indicando que não é a atividade NOX a principal causa de dimerização das Prx. Dessa forma, ainda não está claro porque em neutrófilos as Prx se encontram “presas/travadas” no seu estado oxidado, mas parece improvável que esse fenômeno seja mediado apenas por uma maior produção basal de ERO pela NOX.

Concluindo, mostramos que o *burst oxidativo* é um potente modulador do estado redox das Prx em células inflamatórias, podendo apresentar uma importante função sinalizadora que ainda não foi muito explorada. Além disso, demonstramos pela primeira vez que as Prx em neutrófilos se encontram oxidadas no estado basal. A observação deste fenômeno pode ter implicações muito importantes no estudo da modulação redox das Prx, além de poder apresentar consequências fisiológicas para a função do neutrófilo que ainda não estão descritas. Sendo assim, este trabalho destacou uma característica importante e ainda não descrita para essas proteínas.

## 5. Conclusões e perspectivas

### Estudo 1

- A toxicidade do 2-AAPA nas células A172 não pode ser explicada simplesmente pela sua capacidade de inibir as redutases.
- O correto funcionamento dos sistemas GPx/GSH/GR e Prx/Trx/TrxR é necessário para a proteção das células A172 contra CHP, mas não contra  $H_2O_2$ .
- A toxicidade do 2-AAPA é dependente da oxidação de Prx e disfunção mitocondrial.
- A exposição dessas células a 2-AAPA promoveu um rápido aumento no conteúdo de GSH, e não depende da síntese de GCL.

### Estudo 2

- A diferenciação de células HL60 com DMSO promove uma drástica diminuição na expressão de Prx2.
- A indução do *burst oxidativo* em células HL60 diferenciadas causa uma rápida oxidação na Prx1, e essa oxidação é dependente da atividade da NADPH oxidase.
- Em contraste com as células HL60 diferenciadas, as Prx em neutrófilos humanos se apresentam totalmente oxidadas em situações basais.
- Esta oxidação parece não ser dependente da atividade NOX, uma vez que o DPI um inibidor da NADPH oxidase não reverteu esta oxidação

### Perspectivas

Novas contribuições para o entendimento do metabolismo redox em células cancerígenas são de muito interesse. A modulação dos sistemas da Trx e GSH tem sido explorada para o tratamento com câncer e acreditamos que essa área irá gerar grandes contribuições para futuras terapias. Inibidores das redutases como a carmustina e auranofina já foram testados em diversos tipos celulares e apresentam um grande potencial terapêutico. Neste sentido, a dupla inibição da TrxR e GR provocada pelo 2-AAPA é especialmente interessante, pois diminui o número de drogas a serem utilizadas, simplificando a análise e evitando reação cruzada. Um dado relevante que obtivemos é que o 2-AAPA não

alterou a capacidade de detoxificação nem a vulnerabilidade de células A172 a  $H_2O_2$ , mas tornou células SH-SY5Y mais vulneráveis ao peróxido. Assim, futuros experimentos são necessários para determinar a interação entre os diferentes sistemas peroxidáticos, e como isto promove a proteção celular. A identificação de estratégias para minar a capacidade de proteção de células cancerígenas contra peróxidos pode contribuir para o descobrimento de terapias mais efetivas. Tendo em vista a grande importância da GSH na proteção de células cancerígenas, o entendimento completo do ciclo da GSH nestas células também pode trazer ideias para novas terapias. Especialmente na identificação dos mecanismos que levaram ao rápido aumento nos níveis GSH em células A172 expostas ao 2-AAPA. A identificação de possíveis parceiros de ligação com a Prx em condições oxidativas pode ajudar a esclarecer as vias de sinalização responsáveis pela morte e sobrevivência dessas células. Por último, a identificação dos mecanismos pelo qual o tratamento com 2-AAPA causa disfunção mitocondrial nessas células pode ser relevante, e acreditamos que a ATP sintase pode ser considerado como um possível alvo do 2-AAPA.

O estudo do metabolismo das Prx em neutrófilos é escasso, destacando um grande horizonte para novos estudos. Neste trabalho, demonstramos que a ativação da NOX leva a uma rápida e prolongada oxidação da Prx1 em células dHL60 com fenótipo de neutrófilo, o que é de grande relevância para o entendimento da sinalização celular em células inflamatórias. A identificação de parceiros de ligação das Prx nessas situações também pode prover um maior entendimento para a função dessas células. Talvez o dado mais relevante deste trabalho seja a identificação de que as Prx estão oxidadas em condições basais. Esta observação pode permitir o entendimento de como acontece a modulação redox destas proteínas. Além disso, não se conhece nada sobre o papel modulatório das Prx na função dos neutrófilos, podendo ter uma grande importância na apoptose ou no controle da inflamação que é mediado por essas células.

## Referências

- ABRAMOV, A. Y.; SCORZIELLO, A.; DUCHEN, M. R. Cellular/Molecular Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1129–1138, 2007.
- AMBRUSO, D. R. et al. Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 2, p. 306–15, 2012.
- ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature medicine**, v. 10 Suppl, n. July, p. S18–S25, 2004.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. **The thioredoxin system in cancer Seminars in Cancer Biology**, 2006.
- ARNÉR, E. S. J.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 300, p. 226–239, 1998.
- ARROYO, A. et al. NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49965–75, 20 dez. 2002.
- ASLUND, F. et al. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 6161–5, 25 maio 1999.
- AYKIN-BURNS, N. et al. Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. **The Biochemical journal**, v. 418, n. 1, p. 29–37, 15 fev. 2009.
- BALIGA, M. S. et al. Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. **Biological Trace Element Research**, v. 115, n. 3, p. 227–241, mar. 2007.
- BATY, J. W.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C. C. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. **The Biochemical journal**, v. 389, n. Pt 3, p. 785–95, 1 ago. 2005.
- BAYER, S. B. et al. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation. **FASEB Journal**, v. 27, n. 8, p. 3315–3322, 2013.
- BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H. NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. **Biochimie**, v. 89, n. 9, p. 1107–1112, 2007.
- BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from

chemistry to functional significance. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 13, p. 1557–1593, 2013.

BIZZAZERO, O. A. et al. Acute depletion of reduced glutathione causes extensive carbonylation of rat brain proteins. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 4, p. 656–667, mar. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **The Biochemical journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 15 abr. 2011.

BREITMAN, T. R.; SELONICK, S. E.; COLLINS, S. J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 5, p. 2936–40, maio 1980.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; FLOHE, L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 8, p. 2335–2381, 2011.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289–303, maio 2013.

BROWN, K. K.; COX, A. G.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial respiratory chain involvement in peroxiredoxin 3 oxidation by phenethyl isothiocyanate and auranofin. **FEBS Letters**, v. 584, n. 6, p. 1257–1262, 19 mar. 2010.

BYLUND, J. et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1834–1845, 2010.

CAO, Z.; LINDSAY, J. G. The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. In: **Sub-cellular biochemistry**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. v. 83p. 127–147.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, n. 1955, p. 484–490, 1985.

CEBULA, M.; SCHMIDT, E. E.; ARNÉR, E. S. J. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 10, p. 823–53, 1 out. 2015.

CECARINI, V. et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1773, n. 2, p. 93–104, fev. 2007.

CHAE, H. Z. et al. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. **Diabetes research and clinical practice**, v. 45, n. 2–3, p. 101–12, set. 1999.

CHANG, T. S. et al. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 41975–41984, 1 out. 2004.



- CHAPMAN, A. L. P. et al. Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 9757–9762, 2002.
- CHEN, L. et al. Lipid peroxidation up-regulates BACE1 expression in vivo: A possible early event of amyloidogenesis in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 1, p. 197–207, 2008.
- CHENG, W. H. et al. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 8, p. 1445–50, 1997.
- COLLINS, S. J. et al. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 5, p. 2458–2462, 1978.
- COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p. 27–42, fev. 2016.
- COX, A. G. et al. The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 9, p. 1097–1109, 2008a.
- COX, A. G. et al. Oxidation of mitochondrial peroxiredoxin 3 during the initiation of receptor-mediated apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 1001–1009, 2008b.
- COX, A. G. et al. Redox Potential and Peroxide Reactivity of Human Peroxiredoxin 3. **Biochemistry**, v. 48, n. 27, p. 6495–6501, 14 jul. 2009.
- COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **The Biochemical Journal**, v. 425, n. 2, p. 313–25, 2010a.
- COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Measuring the redox state of cellular peroxiredoxins by immunoblotting. **Methods in enzymology**, v. 474, p. 51–66, 2010b.
- CRACK, P. J. et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1389–1399, 20 dez. 2001.
- DAGNELL, M. et al. Selective activation of oxidized PTP1B by the thioredoxin system modulates PDGF- receptor tyrosine kinase signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 33, p. 13398–13403, 13 ago. 2013.
- DALLE-DONNE, I. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 12, p. 1624–1632, 15 dez.

2001.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, mar. 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 883–898, 2007.

DAMDIMOPOULOS, A. E. et al. Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 36, p. 33249–57, 6 set. 2002.

DAMGAARD, D. et al. Reduced glutathione as a physiological co-activator in the activation of peptidylarginine deiminase. **Arthritis Research & Therapy**, v. 18, n. 1, p. 102, 5 dez. 2016.

DE HAAN, J. B. et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22528–22536, 28 ago. 1998.

DECOURSEY, T. E.; LIGETI, E. **Regulation and termination of NADPH oxidase activity** *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhäuser-Verlag, , 29 out. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5177-1>>. Acesso em: 11 jul. 2016

DELAUNAY, A. et al. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell**, v. 111, n. 4, p. 471–481, 15 nov. 2002.

DHAR, S. K.; ST. CLAIR, D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 11–12, p. 2209–2222, 2012.

DIZDAROGLU, M. et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. <sup>2</sup>Guest Editor: Miral Dizdaroglu. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102–1115, jun. 2002.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Respiration-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27850–27858, 3 set. 2010.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1–2, p. 157–165, 1 jan. 2005.

DU, Y. et al. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 45, p. 38210–38219, 2 nov. 2012.

EKLUND, H.; FONTECAVE, M. Glycyl radical enzymes: a conservative structural basis for radicals. **Structure**, v. 7, n. 11, p. R257–R262, 15 nov. 1999.

- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.
- ERIKSSON, S. et al. Dietary methionine can sustain cytosolic redox homeostasis in the mouse liver. **Nature communications**, v. 6, p. 6479, 20 jan. 2015.
- FIASCHI, T. et al. Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22983–91, 11 ago. 2006.
- FLINT, D. H.; TUMINELLO, J. F.; EMPTAGE, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 30, p. 22369–22376, 25 out. 1993.
- FLOHÉ, L. et al. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 3, p. 763–80, ago. 2011.
- FOLDA, A. et al. Mitochondrial Thioredoxin System as a Modulator of Cyclophilin D Redox State. **Scientific reports**, v. 6, p. 23071, 15 jan. 2016.
- FRANKLIN, C. C. et al. **Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase** *Molecular Aspects of Medicine*, 2009.
- FRANSEN, M. et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n. 9, p. 1363–73, set. 2012.
- FRASER, J. A. et al. The Modifier Subunit of Drosophila Glutamate-Cysteine Ligase Regulates Catalytic Activity by Covalent and Noncovalent Interactions and Influences Glutathione Homeostasis in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46369–46377, 21 nov. 2003.
- FRIJHOFF, J. et al. The mitochondrial reactive oxygen species regulator p66Shc controls PDGF-induced signaling and migration through protein tyrosine phosphatase oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 268–277, 2014.
- GACESA, R. et al. Rising levels of atmospheric oxygen and evolution of Nrf2. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 27740, 14 jun. 2016.
- GARDNER, P. R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 29, p. 19328–19333, 15 out. 1991.
- GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. **Analytical biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 42–6, maio 2002.
- GLOIRE, G.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1493–1505, 2006.
- GRIFFITH, O. W. **Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis**. *Free Radical Biology and Medicine*. **Anais...** 1999
- HABENER, A. et al. MitoNEET protects HL-1 cardiomyocytes from

oxidative stress mediated apoptosis in an in vitro model of hypoxia and reoxygenation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156054, 31 maio 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford University Press, USA: Oxford University Press, USA, 2007.

HAMPTON, M. B. et al. Oxidant-mediated phosphatidylserine exposure and macrophage uptake of activated neutrophils: possible impairment in chronic granulomatous disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 5, p. 775–81, maio 2002.

HAMPTON, M. B.; CONNOR, K. M. O. Peroxiredoxins and the Regulation of Cell Death. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 1, p. 72–76, 31 jan. 2016.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3512–3517, 1996.

HAN, D. et al. Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 627–639, 2006.

HARRIS, I. S. et al. Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. **Cancer Cell**, v. 27, n. 2, p. 211–222, 9 fev. 2015.

HAUERT, A. B. et al. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 7, p. 838–854, 2002.

HILL, B. G. et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. **Biological Chemistry**, v. 393, n. 12, p. 1485–1512, 1 jan. 2012.

HIROTSU, S. et al. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12333–8, 26 out. 1999.

HOFFMAN, D. L.; BROOKES, P. S. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 24, p. 16236–45, 12 jun. 2009.

HOFMANN, B.; HECHT, H.-J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 3–4, p. 347–64, 12 jan. 2002.

HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 120–124, 2010.

HSU, J.-L. et al. Catalytic Properties of Human Manganese Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17687–17691,

26 jul. 1996.

ISHII, T.; WARABI, E.; YANAGAWA, T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 50, n. 2, p. 91–105, 2012.

JANG, H. H. et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 625–35, 28 maio 2004.

JARVIS, R. M.; HUGHES, S. M.; LEDGERWOOD, E. C. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1522–1530, 2012.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 295, n. 4, p. C849–68, out. 2008.

KANG, S. W. et al. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: Therapeutic implications. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 12, p. 571–578, 2005.

KETTLE, A. J. et al. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 46, n. 16, p. 4888–4897, 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 25 fev. 2013.

KORSHUNOV, S. S.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 416, n. 1, p. 15–18, 13 out. 1997.

KUMAR, V. et al. Reversible oxidation of mitochondrial peroxiredoxin 3 in mouse heart subjected to ischemia and reperfusion. **FEBS Letters**, v. 583, n. 6, p. 997–1000, 18 mar. 2009.

KWON, J. et al. Peroxiredoxin 6 (Prdx6) supports NADPH oxidase1 (Nox1)-based superoxide generation and cell migration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 96, p. 99–115, 2016.

LEBOVITZ, R. M. et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9782–9787, 1996.

LIDDELL, J. R. et al. Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. **GLIA**, v. 54, n. 8, p. 873–879, dez. 2006.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1304–1317, 2008.

LOPERT, P.; DAY, B. J.; PATEL, M. Thioredoxin Reductase Deficiency Potentiates Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in

- Dopaminergic Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50683, 30 nov. 2012.
- LOPES, F. M. et al. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. **Neurotoxicity Research**, p. 1–15, 2 fev. 2017.
- LOW, F. M. et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2611–7, 15 mar. 2007.
- LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75–87, 2014.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–53, 2013.
- LU, W. et al. Peroxiredoxin 2 is upregulated in colorectal cancer and contributes to colorectal cancer cells' survival by protecting cells from oxidative stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 387, n. 1–2, p. 261–270, 15 fev. 2014.
- LUO, H. R.; LOISON, F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. **American journal of hematology**, v. 83, n. 4, p. 288–95, abr. 2008.
- MADRIGAL-MATUTE, J. et al. Thioredoxin-1/peroxiredoxin-1 as sensors of oxidative stress mediated by NADPH oxidase activity in atherosclerosis. **Free radical biology & medicine**, v. 86, p. 352–61, set. 2015.
- MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Research Reviews**, v. 4, n. 2, p. 288–314, 2005.
- MAILLOUX, R. J.; TREBERG, J. R. Protein S-glutathionylation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria. **Redox Biology**, v. 8, p. 110–118, 2016.
- MAILLOUX, R. J.; WILLMORE, W. G. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 2, n. November, p. 68, 17 nov. 2014.
- MARZANO, C. et al. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 872–881, 2007.
- MAULIK, N.; DAS, D. K. **Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2008.
- MCCORD, J. M.; KEELE, B. B.; FRIDOVICH, I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 5, p. 1024–7, maio 1971.
- MIROCHNITCHENKO, O. et al. Endotoxemia in Transgenic Mice Overexpressing Human Glutathione Peroxidases. **Circulation Research**, v.

87, n. 4, 2000.

MITOZO, P. A. et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 69–77, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MULLEN, L. et al. Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent Secretion. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 21, p. 98–108, jan. 2015.

MUMBENGEGWI, D. R. et al. Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 11, p. 3700–12, 2008.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological reviews**, v. 219, p. 88–102, out. 2007.

NETTO, L. E. S. et al. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. **Free Radical Research**, v. 50, n. 2, p. 206–245, 8 fev. 2016.

NOH, E. M. et al. Dimethylsulfoxide (DMSO) induces downregulation of heme oxygenase-1 (HO-1) in HL-60 cells: Involvement of HO-1 in HL-60 cell differentiation. **BMB Reports**, v. 44, n. 11, p. 753–757, nov. 2011.

NONN, L.; BERGGREN, M.; POWIS, G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. **Molecular cancer research : MCR**, v. 1, n. 9, p. 682–9, jul. 2003.

NORDENFELT, P. et al. Phagocytosis of streptococcus pyogenes by all-trans retinoic acid-differentiated HL-60 cells: Roles of azurophilic granules and NADPH oxidase. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7363, 6 out. 2009.

NUNES, M. E. et al. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. **Molecular neurobiology**, 27 maio 2016.

OGINO, T.; PACKER, L.; MAGUIRE, J. J. Neutrophil antioxidant capacity during the respiratory burst: Loss of glutathione induced by chloramines. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 445–452, 1997.

PANICH, U. et al. Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging. **Stem cells international**, v. 2016, p. 7370642, jan. 2016.

PARK, M. H. et al. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative

diseases and inflammatory diseases. **Pharmacology & therapeutics**, 26 abr. 2016.

PARSONAGE, D.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8209–14, 17 jun. 2008.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, n. 1, p. 19–39, jul. 2003.

PAULSEN, C. E.; CARROLL, K. S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. **Chemical reviews**, v. 113, n. 7, p. 4633–79, 10 jul. 2013.

PEDRAJAS, J. R. et al. Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. **Antioxidants & redox signaling**, 19 ago. 2015.

PERALTA, D. et al. A proton relay enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 2, p. 156–63, fev. 2015.

PERKINS, A. et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 8, p. 435–45, ago. 2015.

PESKIN, A. V. et al. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11885–11892, 20 abr. 2007.

POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A.; CLAIBORNE, A. Protein sulfenic acids in redox signaling. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, n. 1, p. 325–347, 10 fev. 2004.

POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 2, p. 906–12, 2014.

RATZ, J. D. et al. Effects of the Flavoprotein Inhibitor, Diphenyleneiodonium Sulfate, on Ex Vivo Organic Nitrate Tolerance in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 293, n. 2, 2000.

RHEE, S. G. Overview on Peroxiredoxin. **Molecules and cells**, v. 39, n. 1, p. 1–5, 31 jan. 2016.

RIDDELL, J. R. et al. Peroxiredoxin 1 Stimulates Secretion of Proinflammatory Cytokines by Binding to TLR4. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, 2010.

RIGOBELLO, M. P. et al. The modulation of thiol redox state affects the production and metabolism of hydrogen peroxide by heart mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, n. 2, p. 112–122, 2005.

RODER, C.; THOMSON, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a



- Golden New Age. **Drugs in R and D**, v. 15, n. 1, p. 13–20, mar. 2015.
- ROGERS, L. K. et al. Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 2, p. 367–373, 1 dez. 2004.
- ROH, J.-L. et al. Targeting of the Glutathione, Thioredoxin, and Nrf2 Antioxidant Systems in Head and Neck Cancer. **Antioxidants & Redox Signaling**, p. ars.2016.6841, 14 nov. 2016.
- ROSE, R.; BODE, A. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. **FASEB J**, v. 7, n. 12, p. 1135–1142, 1 set. 1993.
- SACCOCCIA, F. et al. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. **Structure (London, England : 1993)**, v. 20, n. 3, p. 429–39, 7 mar. 2012.
- SALZANO, S. et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 33, p. 12157–62, 19 ago. 2014.
- SCARBROUGH, P. M. et al. Simultaneous inhibition of glutathione- and thioredoxin-dependent metabolism is necessary to potentiate 17AAG-induced cancer cell killing via oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 2, p. 436–443, 2012.
- SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, jun. 2001.
- SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1755–1766, 2006.
- SCHRÖDER, E. et al. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. **Structure (London, England : 1993)**, v. 8, n. 6, p. 605–15, 15 jun. 2000.
- SCHUMACKER, P. Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. **Cancer Cell**, v. 27, n. 2, p. 156–157, fev. 2015.
- SEEFELDT, T. et al. Characterization of a novel dithiocarbamate glutathione reductase inhibitor and its use as a tool to modulate intracellular glutathione. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 5, p. 2729–37, 30 jan. 2009.
- SEO, M. S. et al. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20346–54, 7 jul. 2000.
- SHI, Z. Z. et al. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5101–6, 2000.
- SIMONS, A. L. et al. Inhibition of glutathione and thioredoxin metabolism enhances sensitivity to perifosine in head and neck cancer cells. **Journal of**

**oncology**, v. 2009, p. 519563, 2009.

SOBOTTA, M. C. et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 64–70, 24 nov. 2014.

STACEY, M. M. et al. Chloramines and hypochlorous acid oxidize erythrocyte peroxiredoxin 2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1468–1476, 2009.

STARKOV, A. A. et al. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 36, p. 7779–88, 8 set. 2004.

SWAIN, S. D.; ROHN, T. T.; QUINN, M. T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxidants & redox signaling**, v. 4, n. 1, p. 69–83, 5 fev. 2002.

TAKEBE, G. et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 43, p. 41254–8, 25 out. 2002.

TANAKA, G. et al. Dual pharmacological inhibition of glutathione and thioredoxin systems synergizes to kill colorectal carcinoma stem cells. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 9, p. 2544–2557, jul. 2016.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 508, 2014.

TEIXEIRA, F. et al. Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 7, p. E616–24, 17 fev. 2015.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, mar. 1969.

TREVISAN, R. et al. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Marine environmental research**, v. 101, p. 81–90, out. 2014.

TRUJILLO, M. et al. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. **Sub-cellular biochemistry**, v. 44, p. 83–113, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress | BenthamScience. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n.

10, p. 1161–208, jan. 2005.

WATSON, R. W. G. Redox regulation of neutrophil apoptosis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 4, n. 1, p. 97–104, 5 fev. 2002.

WATSON, W. H.; CHEN, Y.; JONES, D. P. Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. **BioFactors**, v. 17, n. 1–4, p. 307–314, 2003.

WINTERBOURN, C. C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. **Biochimica et biophysica acta**, v. 840, n. 2, p. 204–10, 18 jun. 1985.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 278–86, maio 2008.

WINTERBOURN, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. **Methods in enzymology**, v. 528, p. 3–25, jan. 2013.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549–561, 2008.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Redox biology: signaling via a peroxiredoxin sensor. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 1, p. 5–6, jan. 2015.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642–660, 2013.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 765–792, 2 jun. 2016.

WOO, H. A. et al. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47361–47364, 2003.

WOOD, Z. A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 32–40, 2003.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5619, p. 650–3, 2003.

XIE, J. et al. Evaluation of a dithiocarbamate derivative as a model of thiol oxidative stress in H9c2 rat cardiomyocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 70, p. 214–222, 2014.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 3, p. 165–176, mar. 2016.

YANG, Y. et al. Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 2, p. 372–381, 2007.

YANT, L. J. et al. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 496–502, 2003.

ZHANG, H. et al. Glutaredoxin 2 Reduces Both Thioredoxin 2 and Thioredoxin 1 and Protects Cells from Apoptosis Induced by Auranofin and 4-Hydroxynonenal. **Antioxidants & redox signaling**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 10 ago. 2014.

ZHAO, Y. et al. Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 485, n. 1, p. 56–62, 2009a.

ZHAO, Y. et al. Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 2, p. 176–83, 15 jul. 2009b.

**Anexo I - Publicações e outras atividades desenvolvidas durante o doutorado**

## Doutorado Sanduíche

Estágio no *Center for Free Radical Research*, University of Otago, Nova Zelândia.

Tempo: 12 meses.

Tema: Estudo da modulação redox das peroxirredoxinas durante o *burst oxidativo* em neutrófilos humanos e células HL-60.

Supervisora: Dra. Christine Winterbourn.

## Publicações

1. Lieberknecht, V., Cunha, M.P., Junqueira, S.C., Coelho, I. dos S., de Souza, L.F., dos Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., Dutra, R.C., Dafre, A.L., 2017. Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. *Behav. Brain Res.* 320, 365–373. doi:10.1016/j.bbr.2016.11.007
2. Uchoa, M.F., de Souza, L.F., Dos Santos, D.B., Peres, T.V., Mello, D.F., Leal, R.B., Farina, M., Dafre, A.L., 2016. Modulation of Brain Glutathione Reductase and Peroxiredoxin 2 by  $\alpha$ -Tocopheryl Phosphate. *Cell. Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s10571-015-0298-z
3. Lieberknecht, V., Junqueira, S.C., Cunha, M.P., Barbosa, T.A., de Souza, L.F., Coelho, I.S., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., Dafre, A.L., Dutra, R.C., 2016. Pramipexole, a Dopamine D2/D3 Receptor-Preferring Agonist, Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development in Mice. *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-016-9717-5
4. Ávila, L.C.M., Bruggemann, T.R., Bobinski, F., da Silva, M.D., Oliveira, R.C., Martins, D.F., Mazzardo-Martins, L., Duarte, M.M.M.F., de Souza, L.F., Dafre, A., Vieira, R. de P., Santos, A.R.S., Bonorino, K.C., Hizume Kunzler, D. de C., 2015. Effects of High-Intensity Swimming on Lung Inflammation and

Oxidative Stress in a Murine Model of DEP-Induced Injury. PLoS One 10, e0137273. doi:10.1371/journal.pone.0137273

5. Bruggemann, T.R., Avila, L.M., Fortkamp, B., Greiffo, F.R., Bobinski, F., Martins, D., Duarte, M.M.M.F., Dafre, A., Santos, A.R.S., Silva, M.D., Souza, L.F., Vieira, R.P., 2014. Effects of Swimming on the Inflammatory and Redox Response in a Model of Allergic Asthma. *Int. J. Sports Med.* doi:10.1055/s-0035-1549904
6. Schmitz, A.E., De Oliveira, P.A., De Souza, L.F., Da Silva, D.G.H., Danielski, S., Santos, D.B., De Almeida, E.A., Prediger, R.D., Fisher, A., Farina, M., Dafre, A.L., 2014. Interaction of curcumin with manganese may compromise metal and neurotransmitter homeostasis in the hippocampus of young mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 399–409. doi:10.1007/s12011-014-9951-5
7. Mendes Arent, A., Souza, L.F. de, Walz, R., Dafre, A.L., 2014. Perspectives on molecular biomarkers of oxidative stress and antioxidant strategies in traumatic brain injury. *Biomed Res. Int.* doi:10.1155/2014/723060
8. Gonçalves-Neto, L.M., Ferreira, F.B.D., Souza, L., dos Santos, C., Boschero, A.C., Facundo, V.A., Santos, A.R.S., Nunes, E.A., Rafacho, A., 2014. Disruption of glucose tolerance caused by glucocorticoid excess in rats is partially prevented, but not attenuated, by arjunolic acid. *Indian J. Exp. Biol.* 52, 972–82.

**Anexo II – Estudos relacionados a esta tese deram origem aos seguintes manuscritos.**





## RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells

Fernanda M. Lopes<sup>1,2</sup> · Leonardo Lisboa da Motta<sup>1</sup> · Marco A. De Bastiani<sup>1</sup> · Bianca Pfaffenseller<sup>1</sup> · Bianca W. Aguiar<sup>1</sup> · Luiz F. de Souza<sup>3</sup> · Geancarlo Zanatta<sup>1,4</sup> · Daiani M. Vargas<sup>1</sup> · Patricia Schönhofen<sup>1</sup> · Giovana F. Londero<sup>1</sup> · Liana M. de Medeiros<sup>1</sup> · Valder N. Freire<sup>4</sup> · Alcir L. Dafre<sup>3</sup> · Mauro A. A. Castro<sup>5</sup> · Richard B. Parsons<sup>2</sup> · Fabio Klamt<sup>1</sup>

Received: 21 November 2016 / Revised: 28 December 2016 / Accepted: 30 December 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2017

**Abstract** Research on Parkinson's disease (PD) and drug development is hampered by the lack of suitable human in vitro models that simply and accurately recreate the disease conditions. To counteract this, many attempts to differentiate cell lines, such as the human SH-SY5Y neuroblastoma, into dopaminergic neurons have been undertaken since they are easier to cultivate when compared with other cellular models. Here, we characterized neuronal features discriminating undifferentiated and retinoic

acid (RA)-differentiated SH-SY5Y cells and described significant differences between these cell models in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) cytotoxicity. In contrast to undifferentiated cells, RA-differentiated SH-SY5Y cells demonstrated low proliferative rate and a pronounced neuronal morphology with high expression of genes related to synapse vesicle cycle, dopamine synthesis/degradation, and of dopamine transporter (DAT). Significant differences between undifferentiated and RA-differentiated SH-SY5Y cells in the overall capacity of antioxidant defenses were found; although RA-differentiated SH-SY5Y cells presented a higher basal antioxidant capacity with high resistance against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> insult, they were twofold more sensitive to 6-OHDA. DAT inhibition by 3 $\alpha$ -bis-4-fluorophenyl- methoxytropine and dithiothreitol (a cell-permeable thiol-reducing agent) protected RA-differentiated, but not undifferentiated, SH-SY5Y cells from oxidative damage and cell death caused by 6-OHDA. Here, we demonstrate that undifferentiated and RA-differentiated SH-SY5Y cells are two unique phenotypes and also have dissimilar mechanisms in 6-OHDA cytotoxicity. Hence, our data support the use of RA-differentiated SH-SY5Y cells as an in vitro model of PD. This study may impact our understanding of the pathological mechanisms of PD and the development of new therapies and drugs for the management of the disease.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12640-016-9699-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Fernanda M. Lopes  
fe.m.lopes@gmail.com

✉ Fabio Klamt  
fabio.klamt@ufmg.br

<sup>1</sup> Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, 2600 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

<sup>2</sup> Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, UK

<sup>3</sup> Cellular Defenses Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

<sup>4</sup> Department of Physics, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE 60455-760, Brazil

<sup>5</sup> Bioinformatics and Systems Biology Laboratory, Polytechnic Center, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR 81520-260, Brazil

**Keywords** SH-SY5Y cells · Retinoic acid · Parkinson's disease · Experimental model · 6-hydroxydopamine · Dopamine transporter

**Artigo submetido para publicação.**

**Inhibition of reductase systems by 2-AAPA modulates peroxiredoxin oxidation and mitochondrial function in A172 glioblastoma cells**

Luiz Felipe de Souza<sup>a,\*</sup>, Ariana Ern Schmitz<sup>a</sup>, Luana Caroline Schüller da Silva<sup>a</sup>, Karen Andrinéia de Oliveira<sup>b</sup>, Cláudia Beatriz Nedel<sup>b</sup>, Carla Inês Tasca<sup>a</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>a</sup>, Marcelo Farina<sup>a</sup>, Alcir Luiz Dafre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

\* Corresponding author: Luiz Felipe de Souza, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil. Email: luiz.f.souza@live.com ; Phone: +55 48 3721 2817

**Abstract**

Thiol homeostasis has a critical role in the maintenance of proper cellular functions and survival, being coordinated by the action of several reductive enzymes, including glutathione (GSH)/glutathione reductase (GR) and thioredoxin (Trx)/thioredoxin reductase (TrxR) systems. Here, we investigated the effects of the GR inhibitor 2-acetylamino-3-[4-(2-acetylamino-2-carboxyethylsulfanylthiocarbonylamino)phenylthiocarbamoylsulfanyl]propionic acid (2-AAPA) on the activity of thiol reductases (GR and TrxR), redox balance and mitochondrial function of A172 glioblastoma cells. 2-AAPA inhibited cell GR ( $IC_{50} = 6.7 \mu M$ ) and TrxR ( $IC_{50} = 8.7 \mu M$ ). A significant decrease in the cellular ability to decompose cumene hydroperoxide was observed and associated to a greater susceptibility to this peroxide. The redox state of peroxiredoxins (Prx1, Prx2 and Prx3) was markedly shifted to dimer 30 min after treatment with  $100 \mu M$  2-AAPA, an event preceding 2-AAPA-induced decrease in cell viability. Furthermore, mitochondrial function was also severely impaired, leading to a decrease in the respiratory control ratio, reserve capacity, and ATP synthesis-coupled respiration, as well as an increase in mitochondrial membrane potential. Our results indicate that inhibition of GR and TrxR activities, disruption of the ability to detoxify peroxides, increased oxidation of Prxs, as well as compromised mitochondrial function represent early events mediating 2-AAPA toxicity to A172 glioblastoma cells.

**Keywords:** glutathione reductase; thioredoxin reductase; thiol metabolism; 2-AAPA; peroxiredoxins

### **Redox properties of peroxiredoxins in neutrophils and HL-60 cells**

Luiz Felipe de Souza<sup>1</sup>, Andree Pearson<sup>2</sup>, Alcir Luiz Dafre<sup>1</sup>, Mark B Hampton<sup>2</sup>, Christine Winterbourn<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Santa Catarina, Department of Biochemistry, 88040-900 Florianópolis, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pathology and National Research Centre for Growth and Development, University of Otago Christchurch, PO Box 4345, Christchurch 8040, New Zealand

## Abstract

The peroxiredoxin (Prx) family of thiol peroxidases play key roles in modulating redox processes in cells. Neutrophils take advantage of reactive species, including the production of large amounts of oxidants, as host cells defense weapons, but the physiologic roles of such reactive species is less known. The redox modulation of Prxs by oxidants in neutrophils has not yet been studied in detail. Here we used the HL-60 promyelocytic cell line differentiated to a neutrophil-like phenotype as a model of phagocytic cell to study the redox modulation of Prxs. Interestingly, we found that differentiated HL-60 (dHL-60) cells with DMSO is accompanied by a decrease in the expression of Prx2. Stimulation of dHL-60 cells with PMA induced a time dependent dimerization of Prx1 in both DMSO and ATRA dHL-60 cells. Incubation of DMSO dHL-60 cells with PMA for 1h leads to Prx hyperoxidation. Prx1 dimerization was also observed when cells were stimulated in the presence of *Staphylococcus aureus*, which was blocked by a pre-treatment with DPI, a known inhibitor of the NADPH oxidase. Interestingly, DPI alone was able to decrease Prx1 dimerization under rest conditions in dHL-60 cells, suggesting that NADPH oxidase activity might play an important role in modulating Prxs redox state on rest conditions and upon stimulation. We also studied Prxs in human neutrophils. Contrary to the dHL-60 cell model, in neutrophils, Prx 1 and 2 were almost completely dimerized under rest conditions. In these cells, DPI was not able to decrease the dimerization of Prx2. Although Prxs seem to be “locked” at its dimeric state in neutrophils, thioredoxin 1/thioredoxin reductase 1(Trx1/TrxR1), were detected by Western blot, suggesting that dimerization is not due to the lack of its reducing systems. Furthermore, we found Prx2 diffused in the cytosol of the cells, indicating that the dimerization is not related to compartmentalization. Further experiments are required to identify the possible consequences for cell function, regarding these apparent dimeric “lock” state of cytosolic Prxs.

**Keywords:** Peroxiredoxin; Neutrophil; HL-60 promyelocytic cells; NADPH oxidase; redox.

**Artigo submetido para publicação.****Methylglyoxal-induced protection response and toxicity: role of glutathione reductase and thioredoxin systems**

Ariana Ern Schmitz<sup>1,#</sup>; Luiz Felipe de Souza<sup>1,#</sup>; Barbara dos Santos<sup>1</sup>; Pamela Maher<sup>2</sup>, Fernanda Martins Lopes<sup>3</sup>, Giovana Ferreira Londero<sup>3</sup>, Fabio Klamt<sup>3</sup>, Alcir Luiz Dafre<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil*

<sup>2</sup> *Cellular Neurobiology Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, CA 92037 La Jolla*

<sup>3</sup> *Laboratory of Cellular Biochemistry, Post-Graduate Program in Biochemistry, Biochemistry Department, ICBS/UFRGS, 90035-003 Porto Alegre, Brazil*

\* Correspondence: Alcir Luiz Dafre, *Biochemistry Department, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil; Phone: +55 48 3721 9321; Email address: alcir.dafre@ufsc.br*

Footnote: # Both authors contributed equally.

**Abstract** Thioredoxin (Trx) and glyoxalase (Glo) systems have been suggested to be molecular targets of methylglyoxal (MGO). This highly reactive endogenous compound has been associated to the development of neurodegenerative pathologies and cell death. In the present study, the glutathione (GSH), thioredoxin (Trx) and glyoxalase (Glo) systems were investigated to understand early events (0.5 – 3 h) that may determine cell fate. It is shown for the first time that MGO treatment induces an increase in glutathione reductase (GR) protein in hippocampal slices (1 h) and HT22 nerve cells (0.5 and 2.5 h). Thioredoxin interacting protein, thioredoxin reductase (TrxR), Glo1, and Glo2 were markedly increased (2-4-fold) in hippocampal slices, and 1.2-1.3-fold in HT22 cells. This increase in protein levels in hippocampal slices was followed by the corresponding increase in GR, TrxR and Glo1 activity, but not in HT22 cells. In these cells, GR and TrxR activities were decreased by MGO. This result is in agreement with the idea that MGO can affect Trx/TrxR reducing system, and now we show that GR and Txnip can also be affected by MGO. Impairment in the GR or TrxR reducing capacity can impair peroxide removal by glutathione peroxidase and peroxiredoxin, as both peroxidases depend on reduced GSH and Trx, respectively. In this regard, inhibition of GR and TrxR by 2-AAPA or auranofin, respectively, potentiated MGO toxicity in differentiated SH-SY5Y cells. Overall, MGO triggers a clear defense response in hippocampal slices and HT22 cells, but also impairs the Trx/TrxR and GSH/GR reducing couples in HT22 cells. The increased MGO toxicity by inhibition of GR and TrxR with specific inhibitors, or their inhibition by MGO treatment, supports the notion that both reducing systems are relevant molecular targets of MGO.

**Keywords:** methylglyoxal; glyoxalase; glutathione reductase; thioredoxin reductase, glycation